

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

**Fabíola Karla Corrêa Ribeiro**

**ANÁLISE ESPACIAL DA TRANSMISSÃO DE GENOTIPOS DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EM VITÓRIA, ES-BRASIL**

Vitória  
2015

**Fabíola Karla Corrêa Ribeiro**

**ANÁLISE ESPACIAL DA TRANSMISSÃO DE GENOTIPOS DE  
*Mycobacterium tuberculosis* EM VITÓRIA, ES-BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da  
Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo,  
como pré-requisito para a obtenção do título de  
Doutor em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Palaci

Co-Orientadora: Prof. Dra. Ethel Leonor Noia Maciel

Vitória  
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
TESE DE DOUTORADO

A doutoranda FABÍOLA KARLA CORRÊA RIBEIRO apresentou a tese intitulada “Análise Espacial da Transmissão de Genótipos de *Mycobacterium tuberculosis* em Vitória, ES-Brasil” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu ( **t** ) **aprovar** ( ) **reprovar** a tese para habilitar a mestre em Doenças Infecciosas FABÍOLA KARLA CORRÊA RIBEIRO a obter o Grau de DOUTORA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 26 de fevereiro de 2015

Prof. Dr. Philip Noel Suffys  
(Membro Externo)

Profa. Dra. Martha Maria de Oliveira  
(Membro Externo)

Prof. Dr. Aloisio Falqueto  
(Membro Interno)

Profa. Dra. Liliana Cruz Spano  
(Membro Interno)

Prof. Dr. Moises Palaci  
(Orientador)

Profa. Ethel Leonor Neira Maciel  
(Coorientadora)

Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas – Centro de Ciências da Saúde – UFES  
Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.043-900  
Telefax (27) 3335-7504

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

R484a      Ribeiro, Fabíola Karla Corrêa, 1974 -  
Análise espacial da transmissão de genotipos de  
Mycobacterium tuberculosis em Vitória, ES-Brasil / Fabíola Karla  
Corrêa Ribeiro – 2015.  
78 f. : il.

Orientador: Moisés Palaci.

Coorientador: Ethel Leonor Noia Maciel.

Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Tuberculose. 2. Epidemiologia Molecular. 3. Análise  
Espacial. I. Palaci, Moisés. II. Maciel, Ethel Leonor Noia.  
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências  
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

Aos meus dois grandes amores: Albertone e João Paulo.  
Anjos que alegram meus dias e me fazem acreditar que  
qualquer desafio pode ser superado.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por seu amor infinito. “O Senhor é o meu pastor, nada me faltará”. Salmo 23

Ao Prof. Dr. Moisés Palaci, meu muito obrigado por confiar mais uma vez no meu trabalho, por sua amizade, paciência e orientação ao longo de todos estes anos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ethel Leonor Noia Maciel, mais do que co-orientadora, uma amiga sempre disposta a dividir seus conhecimentos. Obrigada por ter confiado a mim a realização deste trabalho, inicialmente idealizado por você. Obrigada ainda pelo seu apoio constante, por não me deixar desanimar, pelo seu carinho e orientação.

Ao Prof. Dr. Adelmo Inácio Bertolde, pela ajuda na análise espacial dos dados. Sempre paciente, disposto a ajudar e a entender nossos objetivos, contribuiu valiosamente para o nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. William Pan, da Duke University, que, apesar de todas as adversidades, nos auxiliou desde o início, sugerindo as metodologias mais apropriadas a serem utilizadas e realizando parte da análise espacial, além de ter contribuído imensamente na redação e revisão do artigo.

Ao Prof. Dr. Lee Riley, da University of California, Berkeley, e a todos que fazem parte da sua equipe, pela acolhida em seu laboratório. Obrigada pela contribuição contínua, desde o desenho do estudo até a revisão do artigo, passando ainda pela sugestão de colaborações futuras.

À Solange Alves Vinhas, amiga e companheira nessa caminhada, pela disponibilidade na resolução de problemas, auxílio na realização de intermináveis géis e análise dos dados moleculares. Foi uma grande parceria!

Aos farmacêuticos Hebert Silva Marques e Paola Poloni Lobo de Aguiar, sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário.

A Thiago Prado do Nascimento, pela ajuda na seleção inicial dos pacientes, e a Carolina Maia Martins Sales pela disponibilização da compilação das variáveis do censo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida durante os anos de realização deste trabalho.

Aos meus pais Nair Corrêa Ribeiro e Manoel Gomes Ribeiro, que me ensinaram que o sucesso alcançado é sempre fruto do nosso esforço e dedicação. Com eles, aprendi a ter a confiança necessária para lutar pelos meus sonhos.

Ao meu esposo Albertone Sant`Ana Pereira, todo o meu amor e gratidão. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, inclusive nos de stress extremo, sempre paciente e compreensivo. Seu carinho e incentivo ao longo destes anos me fizeram acreditar que tudo iria dar certo.

Ao meu filho, João Paulo, por trazer tanta luz e cor para minha vida. Basta um sorriso seu e nada mais importa....

Aos meus irmãos, sogros, cunhados e concunhados, pelo amor e confiança que sempre tiveram em mim. Somos uma família abençoada por Deus. Estar com vocês me alegra e me fortalece sempre.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elenice Moreira Lemos, amiga-irmã tão querida, pelo exemplo de força, perseverança e profissionalismo. Obrigada por seu apoio e incentivo constantes, pelas longas conversas e por não me deixar desanimar nunca.

A Renata Lyrio Peres, minha amiga muito querida e companheira de turma, que compartilhou comigo tantos momentos de alegrias e desafios. Fomos até o fim, juntas!

A Tatiana e Fabrício, irmãos/compadres/padrinhos/afilhados, porque estar com vocês, é estar em família. Sempre presentes, dispostos a ajudar, amigos pra vida inteira!

Às amigas Carlinha e Valéria, pela amizade e pela torcida. Poucas pessoas tem sempre um sorriso tão fácil e um abraço tão gostoso e apertado pra dar.

Aos meus colegas do Laboratório de TB, por tornarem nossos dias de trabalho tão mais divertidos!

A todos os funcionários do NDI, pelos lanchinhos na cozinha, pelo bate-papo sempre interessante, enfim, por tornarem o ambiente sempre alegre.

Aos amigos do Movimento de Cursilhos de Cristandade. Nossos encontros semanais me enchem de coragem e esperança para superar os obstáculos que encontro pelo caminho.

Aos novos amigos do LACEN-ES, que acompanharam este último ano de desafios para o término deste trabalho. Obrigada pelas palavras de ânimo e incentivo!!

Aos pacientes com tuberculose que, indiretamente, participaram desta pesquisa e que depositam em nós a esperança de viverem dias melhores.



“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

*José de Alencar*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Spoligotipos dos isolados que apresentaram perfis já descritos pelo banco internacional SpolDB4.....	49-51
<b>Tabela 2.</b>	Spoligotipos não identificados pelo banco internacional SpolDB4 (orphans).....	52
<b>Tabela 3.</b>	Comparação da distância média entre pontos, calculada por teste t-Student, para isolados agrupados em clusters, famílias de RFLP e grupo controle.....	55
<b>Tabela 4.</b>	Análise estatística univariada das variáveis individuais.....	56
<b>Tabela 5.</b>	Análise estatística univariada das variáveis socioeconômicas..	57-58
<b>Tabela 6.</b>	Análise estatística multivariada das variáveis significativas.....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Fluxograma dos pacientes incluídos na população de estudo	34
<b>Figura 2.</b>	Perfil genotípico dos 71 <i>clusters</i> identificados após análise pelo RFLP.....	46
<b>Figura 3.</b>	Caracterização dos <i>clusters</i> de acordo com seu tamanho (número de indivíduos em cada <i>cluster</i> ).....	47
<b>Figura 4.</b>	Porcentagem de indivíduos distribuídos em <i>clusters</i> pequenos, médios e grandes.....	47
<b>Figura 5.</b>	(a) Mapa de Kernel dos isolados em <i>clusters</i> (casos) e (b) razão entre as taxas bayesianas empíricas de casos e controles.....	53
<b>Figura 6.</b>	Análise por função K dos cinco maiores <i>clusters</i> identificados no estudo: (a) ES19h, (b) ES14, (c) Es14o, (d) ES1b e (e) ES8. As linhas pontilhadas representam o envelope de confiança de 95% de Completa Aleatoriedade Espacial, enquanto a linha sólida representa os valores obtidos.....	54
<b>Figura 7.</b>	Análise por função K das famílias de RFLP: (a) ES19, (b) ES14, (c) Es1 e (d) ES8. As linhas pontilhadas representam o envelope de confiança de 95% de Completa Aleatoriedade Espacial, enquanto a linha sólida representa os valores obtidos.....	55
<b>Figura 8.</b>	Valores das probabilidades preditivas de transmissão recente da tuberculose calculados para cada bairro.....	59

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1	Tuberculose.....	17
1.1.1	Aspectos Epidemiológicos.....	17
1.1.2	Etiologia e transmissão da infecção.....	18
1.1.3	Características gerais da doença.....	21
1.2	Diagnóstico.....	21
1.3	Tuberculose e Saúde Pública.....	23
1.4	Biologia Molecular como ferramenta em estudos epidemiológicos.....	24
1.5	Geoprocessamento e Análise Espacial.....	28
1.6	Justificativa.....	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
2.1	Objetivo geral.....	32
2.2	Objetivos específicos.....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1	Caracterização da amostra.....	33
3.2	Identificação dos isolados de culturas positivas.....	34
3.3	Subcultivo das cepas.....	34
3.4	Técnicas de tipagem molecular.....	35
3.4.1	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP-IS6110).....	35
3.4.1.1	Extração e purificação do DNA bacteriano.....	35
3.4.1.2	Quantificação e digestão.....	35
3.4.1.3	Separação e transferência para membrana.....	36
3.4.1.4	Preparo e marcação da sonda de DNA.....	36
3.4.1.5	Hibridação do DNA bacteriano com a sonda de DNA marcada.....	36
3.4.1.6	Deteção.....	37
3.4.1.7	Análise do perfil genotípico dos isolados.....	37

3.4.2	Análise da região “Direct Repeat” (DR) – (Spoligotyping – Spacer Oligonucleotide Typing).....	38
3.4.2.1	Amplificação da região DR.....	38
3.4.2.2	Hibridização com a membrana e revelação.....	38
3.4.2.3	Análise dos resultados.....	39
3.5	Construção da base de dados.....	39
3.6	Análise Espacial.....	40
3.6.1	Distribuição espacial dos casos e controles.....	40
3.6.2	Estimativa de densidade de Kernel (Kernel Density Estimation – KDE).....	40
3.6.3	Função K de Ripley.....	41
3.6.4	Análise da média das distâncias entre pontos pelo Teste t-Student....	42
3.6.5	Análise estatística espacial – Modelo logit.....	42
3.7	Considerações Éticas.....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
4.1	Análise do perfil genotípico dos isolados de M. tuberculosis.....	44
4.2	Análise Espacial.....	53
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CAE:** Completa Aleatoriedade Espacial
- CAS:** *Central-Asian*
- DNA:** *Desoxiribonucleic Acid* - Ácido desoxirribonucleico
- DR:** *Direct Repeat*
- EAI:** *East-African-Indian*
- H:** Haarlem
- HIV:** *Human Immunodeficiency Virus* - Vírus da Imunodeficiência Humana
- IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IQU:** Índice de Qualidade Urbana
- IS6110:** Sequência de Inserção 6110
- Kb:** Kilobase
- KDE:** *Kernel Density Estimation* - Estimativa de densidade de Kernel
- LAM:** *Latin American and Mediterranean*
- MS:** Ministério da Saúde
- Mtb/HIV:** co-infecção *M. tuberculosis*/Vírus da imunodeficiência adquirida
- NDI:** Núcleo de Doenças Infecciosas
- OMS:** Organização Mundial de Saúde
- pb:** pares de base
- PNCT:** Programa Nacional de Controle da Tuberculose
- PU:** Padrão único
- RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição baseado no IS6110.
- SEMFA:** Secretaria Municipal da Fazenda (SEMFA)
- SIDA:** Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
- SIG:** Sistemas de Informação Geográfica
- SINAN:** Sistema de Informação de Agravos de Notificação
- SIT:** *Shared International Type*
- SUS:** Sistema Único de Saúde
- TB:** Tuberculose
- UFES:** Universidade Federal do Espírito Santo
- WHO:** World Health Organization

## RESUMO

**Introdução.** A genotipagem de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* permite o estudo da dinâmica da transmissão da tuberculose (TB), enquanto técnicas de geoprocessamento permitem a realização concomitante da análise espacial dos dados clínicos e epidemiológicos. No presente estudo, dados genotípicos e análise especial foram combinados para caracterizar a transmissão da TB em Vitória – ES – Brasil e identificar áreas e fatores de risco associados à transmissão recente da doença. **Material e Métodos.** No período de janeiro de 2003 a dezembro de 2007, 503 isolados foram genotipados pelos métodos de análise de polimorfismo de fragmentos de DNA (RFLP) e *Spoligotyping*. A análise espacial incluiu a estimativa de densidade de Kernel, a análise por função K e uma análise de distâncias pelo teste *t*-Student. Os isolados de *M. tuberculosis* que apresentaram perfis genotípicos idênticos foram agrupados em *clusters* e considerados parte de uma cadeia de transmissão recente (casos). **Resultados.** Dos 503 isolados, 242 (48%) foram categorizados em 70 diferentes *clusters* pertencentes a 12 famílias de RFLP. A taxa de transmissão recente foi de 34.2%. O mapa de densidade de Kernel indicou 3 áreas de maior concentração de casos. A análise por função K mostrou que tanto *clusters* quanto famílias de RFLP tendem a se agrupar no espaço. A análise de distâncias pelo *t*-Student confirmou esses resultados, além de mostrar que isolados com perfis genotípicos únicos (controles) tendem a se distribuir de forma aleatória no espaço. Um modelo *logit* com efeito randômico de vizinhança foi utilizado para análises univariadas e multivariadas dos fatores de risco associados. Quando as probabilidades preditivas calculadas para cada bairro foram mapeadas, foi possível a identificação dos bairros onde é maior o risco de transmissão recente da TB. **Conclusões.** A *clusterização* tanto espacial quanto genotípica dos isolados de *M. tuberculosis* revelou a ocorrência de transmissão recente da TB, causada por um número relativamente pequeno de genotipos, em áreas bem definidas. Esses dados auxiliam no planejamento mais direcionado de estratégias para controle da doença, como, por exemplo, por meio de uma investigação mais rigorosa e orientada dos contatos, levando-se em consideração o território.

Palavras-chave: Tuberculose, Epidemiologia Molecular, Análise Espacial

## ABSTRACT

**Background.** Genotyping *Mycobacterium tuberculosis* isolates allows study of dynamics of tuberculosis (TB) transmission, while geoprocessing allows concomitant spatial analysis of clinical and epidemiological data. In the present study, genotyping data and spatial analysis were combined to characterize TB transmission in Vitória-ES-Brazil to identify distinct neighborhoods and risk factors associated with recent TB transmission. **Methods.** From 2003 to 2007, 503 isolates were genotyped by *IS6110* restriction fragment length polymorphism (RFLP) and spoligotyping. The spatial analysis included Kernel density estimation (KDE), k-function analysis on predicted estimates from a random-effects *logit* model and a t-test distance analysis. *M. tuberculosis* isolates belonging to identical RFLP patterns (clusters) were considered to represent recent TB infection (cases). **Results.** Of 503 genotyped isolates, 242 (48%) were categorized into 70 distinct clusters belonging to 12 RFLP families. The overall proportion of recent transmission was 34.2%. Kernel density maps indicated three areas of most intense concentration of cases. K-function analysis of the largest RFLP clusters and families showed that both co-localized in space. The distance analysis confirmed these results and also showed that unique-pattern strains (controls) randomly distributed in space. A *logit* model with random neighborhood effects was used to evaluate univariate and multivariate associations. When the predicted probabilities for each neighborhood were mapped, they identified the neighborhoods with high risk for recent transmission. **Conclusions.** Spatial and genotypic clustering of *M. tuberculosis* isolates revealed ongoing active transmission of TB caused by a small subset of strains in a subset of neighborhoods of the city. Such information provides an opportunity to target TB transmission control, such as through rigorous and more focused contact investigation programs.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Tuberculose

### 1.1.1 Aspectos Epidemiológicos

Considerada por muitos como uma “doença romântica” relacionada ao estilo de vida boêmio de artistas e intelectuais do passado, a Tuberculose (TB) ainda representa um grave problema de saúde pública mundial, especialmente nos países em desenvolvimento. Apesar de já existirem recursos tecnológicos capazes de promover seu controle, ainda não há perspectiva de eliminação desta doença a curto prazo, a não ser que novas vacinas e/ou medicamentos sejam desenvolvidos. Além disso, a associação da tuberculose com a infecção pelo HIV, a emergência e propagação de cepas resistentes aos fármacos e a deterioração dos sistemas de saúde pública, representam desafios adicionais em escala mundial (NGUYEN et al., 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da TB. Em 2012, estimou-se a ocorrência de 8,6 milhões de casos novos desta doença e um total de aproximadamente 1,3 milhões de mortes, incluindo 350.000 pacientes infectados pelo HIV (WHO, 2014). Entre os anos de 2002 e 2012, uma média de 75 mil casos novos foram notificados no Brasil, o que corresponde a um coeficiente de incidência de aproximadamente 46 novos casos/100.000 habitantes/ano. Esses indicadores colocam o Brasil entre os 22 países priorizados pela OMS que concentram 80% dos casos de TB no mundo (WHO, 2014). Entretanto, apesar da diminuição no número de casos da doença observada em todo o mundo, estima-se que a meta proposta pela OMS, de reduzir em 50% as taxas de prevalência e mortalidade da TB até o ano de 2015, não será atingida (WHO, 2014).

Neste mesmo período, foram notificados no Espírito Santo uma média de 1285 casos novos, com uma incidência de 38 casos/100.000 habitantes/ano (BRASIL – boletim epidemiológico, 2012). O Espírito Santo é constituído por 78 municípios e sua população é de aproximadamente 3.500.000 habitantes. Dos sete municípios

que compõem a região metropolitana da Grande Vitória, o município de Vitória, capital do Estado, é o menor deles com uma população de aproximadamente 330.000 habitantes. Neste município, a taxa de incidência foi de aproximadamente 51 casos/100.000 habitantes, acima das médias nacional e da Região Sudeste, que foram de 41 e 42,6 casos/100.000 habitantes, respectivamente (Sala de Situação em Saúde, MS).

Neste cenário epidemiológico, a co-infecção *M. tuberculosis*/Vírus da imunodeficiência adquirida (Mtb/HIV) ocupa lugar de destaque, sendo descrita por muitos como o “dueto amaldiçoado”, devido ao seu grande impacto econômico e social (SHARMA et al., 2005). Nos pacientes co-infectados por Mtb/HIV, o risco de desenvolver a tuberculose após a infecção primária é extremamente alto (HAVLIR; BARNES, 1999; LIBERATO et al., 2004), podendo ainda ocorrer a reativação de uma infecção latente (NUNN et al., 2005).

Além destes indicadores expressivos e de suas implicações para a humanidade, existe também uma crescente preocupação com o fenômeno de resistência do *M. tuberculosis* a drogas anti-tuberculose (CHAULET et al., 1996; PABLO-MENDES et al., 1998). Este fenômeno é, em grande parte, justificado pela irregularidade ou abandono do tratamento, além do alto custo e escassez de drogas alternativas eficientes contra estes microrganismos; e responsável por diminuir, de forma acentuada, a probabilidade de cura dos doentes acometidos pelos mesmos. Como resultado, estes pacientes transmitem o bacilo por um período de tempo mais prolongado.

### **1.1.2 Etiologia e transmissão da infecção**

O termo “tuberculose” foi possivelmente utilizado pela primeira vez por Shönlein em 1839 (GRANGE, 1996). Esta denominação tornou obsoletos os termos “Tísica” ou “Consumpção”, antes utilizados em alusão à exuberante caquexia característica dos estágios mais avançados desta enfermidade. Um dos mais significativos e completos estudos sobre a tuberculose foi realizado pelo cientista alemão Robert Koch. Em 1882, Koch apresentou à comunidade científica o isolamento e forma de cultivo, a partir de trabéculas maceradas, do *Mycobacterium tuberculosis*,

identificado como o agente etiológico da doença, e que ficou mais conhecido como bacilo de Koch. Por sua contribuição científica, Koch recebeu o prêmio Nobel de Medicina em 1905. O bacilo de Hansen, descoberto alguns anos antes, e o bacilo da tuberculose foram as primeiras espécies incluídas no gênero *Mycobacterium*, descrito, taxonomicamente, por Lehmann e Neuman em 1896 (LEHMANN; NEUMAN, 1896; apud GRANGE, 1996).

O gênero *Mycobacterium* compreende pequenos microrganismos em forma de bastão, com dimensões de 0,2-0,7 x 1,0-10 µm, que não possuem flagelos, não formam esporos e não possuem cápsula. Estes microrganismos diferem dos demais gêneros bacterianos em uma série de aspectos, muitos dos quais relacionados à composição de sua parede celular, formada por uma grande quantidade e variedade de lipídeos. Estima-se que, aproximadamente, 60% do peso seco sejam devidos a ácidos graxos tais como ácidos micólicos e ceras, o que lhe confere resistência peculiar ao álcool-ácido, evidenciada pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen, e resistência a álcalis, ácidos, antissépticos e a um amplo espectro de antibióticos (WAYNE; KUBICA, 1986).

Apesar da abundância de espécies existentes (aproximadamente 169 espécies e 13 sub-espécies descritas no gênero *Mycobacterium* (EUZÉBY, 2014), apenas algumas representantes se adaptaram a algum tipo de hospedeiro ou se tornaram patogênicas para animais e humanos. Dentre as que merecem destaque, está o *M. tuberculosis* que, sem hospedeiros intermediários, reservatórios no meio ambiente ou vetores, encontrou no homem o seu reservatório natural e mantenedor da espécie (WOLINSKY, 1979).

*Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo aeróbio estrito, considerado intracelular facultativo por sua capacidade de multiplicar e sobreviver no interior de células fagocitárias. Seu tempo de geração é longo, de aproximadamente 18 horas, em temperaturas próximas a 37°C. Isso explica a predileção desta bactéria pelos pulmões (devido à tensão de O<sub>2</sub> existente neste órgão), e a demora na sua detecção em meios de cultura e na ação eficiente das drogas utilizadas no tratamento.

Os indivíduos portadores da tuberculose pulmonar são classificados como bacilíferos e não-bacilíferos. Os indivíduos bacilíferos são assim denominados por eliminarem bacilos numa quantidade superior a 5.000/ml de escarro, o que permite a detecção destes microrganismos pela baciloscopia. Os indivíduos denominados não-bacilíferos, ou paucibacilíferos, eliminam menores quantidades de bacilos no escarro, resultando na não detecção dos mesmos pela baciloscopia. É importante ressaltar ainda, que a frequência deste fenômeno é inversamente proporcional à extensão da doença e à presença de cavidades (KIM et al., 1984; PALACI et al., 2007).

A principal fonte de infecção humana é o indivíduo portador da forma pulmonar bacilífera da tuberculose, ou seja, aquele que elimina bacilos no escarro. Ao falar, tossir ou espirrar, esse indivíduo lança no ar gotículas contaminadas de tamanhos variados que podem ser inaladas pelos seus contactantes. Apenas as gotículas com diâmetro de 2 a 10  $\mu\text{m}$  contendo poucos bacilos (núcleos de Wells) conseguem alcançar os bronquíolos e alvéolos pulmonares onde iniciam sua multiplicação. As gotículas maiores são depositadas no trajeto bifurcado da árvore traqueobrônquica e eliminadas pelo mecanismo de defesa mucociliar, sendo deglutidas, inativadas pelo suco gástrico e eliminadas pelas fezes (TARANTINO; LEITÃO DE OLIVEIRA, 1990).

Pacientes paucibacilíferos, mesmo que tenham resultado positivo à cultura, são muito menos eficientes como fontes de transmissão, embora isso possa ocorrer. As formas exclusivamente extrapulmonares não transmitem a doença. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Do ponto de vista epidemiológico, os indivíduos de uma população podem ser classificados em diferentes categorias, segundo suas relações com o agente causal e o ambiente, e em função dos mecanismos patogénéticos da doença. Estima-se que cerca de 10% das pessoas que adquirem a infecção e não recebem a terapia preventiva irão desenvolver a doença; nos 90% restantes, a infecção permanecerá latente ou será eliminada pelas defesas do organismo. O risco é maior nos primeiros dois anos após a infecção, período em que a manifestação da doença é observada em 50% dos casos (BLOOM, 1994). Por outro lado, os bacilos podem permanecer vivos no interior dos granulomas durante toda a vida do indivíduo, reativando-se

diante de condições favoráveis ao seu desenvolvimento (LEITE; TELAROLLI JÚNIOR, 1997). Portanto, a tuberculose pode resultar de uma infecção exógena (infecção recente), causada pelo contágio com um paciente bacilífero, ou de uma infecção endógena (reativação), quando ocorre a recrudescência da infecção primária.

### **1.1.3 Características gerais da doença**

A tuberculose é uma síndrome infecciosa de curso crônico, que acomete com maior frequência os pulmões e apresenta como principais sinais e sintomas: tosse, expectoração por mais de 3 semanas, febre baixa e emagrecimento. O quadro clínico da tuberculose pulmonar pode incluir ainda outras manifestações respiratórias como dispnéia, dor torácica e hemoptise. Esta doença também pode comprometer sítios extrapulmonares. Nesse caso, os principais sítios de implantação são aqueles com maior suprimento sanguíneo e, portanto, de oxigênio, como o córtex renal, o córtex cerebral, as extremidades de crescimento dos ossos longos, as vértebras e adrenais. Na tuberculose disseminada ou miliar, ocorre o comprometimento extensivo dos pulmões, fígado e medula óssea. Algumas condições debilitantes (desnutrição, idade avançada, estresse), a dependência química (drogas e alcoolismo), além de doenças degenerativas e imunossupressoras, são consideradas fatores intrínsecos ao organismo que constituem riscos para o desenvolvimento de ambos os tipos de tuberculose (FIÚZA DE MELO; AFIUNE, 1993).

### **1.2 Diagnóstico**

O diagnóstico da tuberculose tem como base um conjunto de evidências clínicas e epidemiológicas, seguido da confirmação bacteriológica. Os exames utilizados na investigação diagnóstica da TB podem ser presuntivos ou confirmatórios. Do primeiro grupo fazem parte os exames radiográficos, bioquímicos, citológicos, histopatológicos e imunológicos. O segundo grupo consiste dos exames bacteriológicos (baciloscopia e cultura), que detectam a bactéria ou componentes de sua estrutura, e dos testes moleculares, que detectam seqüências específicas de ácidos nucléicos por intermédio de técnicas de biologia molecular.

Nos países em desenvolvimento, a baciloscopia é o método diagnóstico bacteriológico mais empregado nos serviços de saúde em função de sua simplicidade, rapidez e baixo custo. A técnica de Ziehl-Neelsen é a mais utilizada e recomendada pela OMS devido à sua ampla aplicabilidade. Este exame apresenta boa especificidade em áreas de alta taxa de prevalência, porém sua sensibilidade é limitada, pois a presença de bacilos só é detectada se estes estiverem em grande número (5.000 – 10.000/ml) na amostra examinada (HOBBS et al., 1973). Como consequência, apenas 34 – 80% dos casos de tuberculose são diagnosticados por este método, considerado bastante sensível para a detecção de pacientes com doença cavitária, porém pouco sensível para o diagnóstico de pacientes paucibacilíferos (BRODIE; SCHLUGER, 2005).

Um processo considerado fundamental e bastante eficaz no diagnóstico da tuberculose é o cultivo in vitro de micobactérias. Em geral, a sensibilidade da cultura é de 80-85%, com especificidade de aproximadamente 98% (MORGAN et al., 1983; ICHIYAMA et al., 1993). Este método é capaz de detectar um pequeno número de bacilos (10 - 100/ml) na amostra examinada (YEAGER et al., 1967), além de permitir a identificação da micobactéria isolada. Um estudo realizado na região da Grande Vitória, mostrou um aumento de 23,4% no diagnóstico bacteriológico de casos novos da doença, desde que a cultura pelo método Ogawa-Kudoh foi introduzida nos laboratórios das prefeituras como técnica de rotina complementar ao uso da baciloscopia (dados não publicados).

Os testes moleculares para o diagnóstico da TB baseiam-se na amplificação e detecção de sequências específicas do DNA de micobactérias em espécimes clínicos e fornecem resultados em um período de 24-48 horas. Na prática clínica, estes testes permitem uma confirmação mais rápida da TB em 50-60% dos casos com resultado de baciloscopia negativa e cultura positiva. No entanto, a interpretação dos resultados obtidos por estas técnicas deve ser feita de forma cuidadosa, sendo importante destacar que sua utilização não se aplica a casos de controle de tratamento, nem tampouco substitui a realização da cultura (RIBEIRO et al., 2004).

### 1.3 Tuberculose e Saúde Pública

Diagnosticar e tratar correta e prontamente os casos de TB pulmonar são medidas fundamentais para o controle da TB. Esforços devem ser realizados para que a doença seja diagnosticada precocemente e o paciente inicie o tratamento adequado, de forma que a cadeia de transmissão do bacilo seja interrompida. Nesse contexto, a atuação do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) compreende estratégias que visam modificar a situação epidemiológica por meio da redução da morbidade e mortalidade, além de atenuar o sofrimento humano causado pela doença, mediante o uso adequado dos conhecimentos técnicos e científicos e dos recursos disponíveis e mobilizáveis.

Uma das estratégias adotadas pelo PNCT é a busca passiva de casos novos centrada no exame baciloscópico do escarro dos pacientes sintomáticos respiratórios que procuram espontaneamente as unidades de saúde (Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil, 2010). Nas últimas décadas, o MS recomendou que também se fizesse a busca ativa dos contatos (pessoas que convivam regularmente, em um mesmo ambiente, com um paciente diagnosticado com TB), principalmente a nível domiciliar.

No entanto, a transmissão domiciliar, apesar de fazer sentido epidemiológico, parece contribuir em menor escala como fonte de infecção e doença no número de casos notificados da doença. Em um estudo realizado na Bahia para busca de contatos domiciliares de pacientes bacilíferos que apresentavam tuberculose foi encontrado apenas 1.1% de contatos domiciliares com a doença (MOTA et al., 2003). Na América Latina o único estudo realizado sobre o assunto mostrou que, no Peru a transmissão domiciliar era importante até a faixa etária de 5 anos e que acima desta idade a transmissão ocorria na comunidade e não no domicílio (MADICO et al., 1995). Classen e colaboradores (1999) sugeriram que em áreas de alta incidência de TB, contatos extradomiciliares tem um papel importante na transmissão da TB.

Além disso, a busca convencional pelos contatos não é capaz de identificar a transmissão ocorrida durante contatos breves e casuais entre indivíduos (FOK et al.,

2008). Um estudo utilizando técnicas de biologia molecular realizado por Sebek (2000) mostrou que a transmissão ocorre, na maior parte dos casos, a partir do contato do caso índice com outros indivíduos durante um período muito curto de tempo e, dessa forma, difícil de ser detectado através da investigação tradicional. Small e colaboradores (1994), em um estudo realizado em São Francisco, relataram que a busca convencional foi responsável pela identificação de apenas 10% dos contatos de casos notificados. Estes dados indicam que o controle da doença que, atualmente, passa necessariamente pela busca de contactantes de casos índices, deve ser rediscutido à luz destas informações.

Uma alternativa seria focar na busca ativa dos casos índices e seus contatos tendo-se como parâmetro um sistema de vigilância territorial e não domiciliar. Isto seria possível, atualmente, devido aos avanços nas áreas de geoprocessamento e biologia molecular, ferramentas fundamentais para este tipo de abordagem, e que começam a ser utilizadas com maior frequência em países desenvolvidos.

#### **1.4. Biologia Molecular como Ferramenta em Estudos Epidemiológicos**

A epidemiologia molecular utiliza concomitantemente técnicas de biologia molecular, que caracterizam o conteúdo nucleotídico de um isolado, e a epidemiologia clássica, que estuda a distribuição e os fatores determinantes da doença nas populações humanas (FOXMAN; RILEY, 2001).

Nos últimos anos, estudos populacionais de epidemiologia molecular tem sido realizados com o objetivo de se caracterizar os padrões de transmissão da TB e a diversidade de cepas que circulam em diferentes regiões, identificar surtos em populações específicas e fatores de risco associados à transmissão recente da doença (FOK et al., 2008; NGUYEN et al., 2004).

Foram os avanços nas técnicas de biologia molecular que possibilitaram estudos mais aprofundados sobre a transmissão da TB, antes baseados apenas na busca convencional pelos contatos e em outros dados epidemiológicos. Um grande número de marcadores genéticos com diferentes níveis de discriminação, estabilidade e reprodutibilidade, foi identificado nas últimas décadas



(DROBNIEWSKI et al., 1994; SAUNDERS, 1995; KREMER et al., 1999). Estes marcadores permitem determinar se dois ou mais pacientes com TB ativa estão infectados por cepas que possuem perfis genéticos idênticos, que serão agrupados em *clusters*, ou perfis genéticos diferentes entre si, denominados padrões únicos (PU).

A utilização da epidemiologia molecular em estudos de transmissão se baseia no fato de que cepas derivadas recentemente de um mesmo ancestral vão apresentar o mesmo perfil genotípico (Van SOOLINGEN, 2001). Dessa forma, acredita-se que indivíduos que apresentam isolados de *M. tuberculosis* pertencentes a um mesmo *cluster* estão, na maioria das vezes, envolvidos em uma cadeia de transmissão recente da doença, enquanto pacientes infectados por padrões únicos de cepas, representariam casos de reativação endógena da TB (NAVA-AGUILERA et al., 2009).

É fundamental ressaltar que estudos de transmissão consistentes devem minimamente considerar alguns aspectos importantes: região geográfica claramente definida, duração do estudo (no mínimo 2-4 anos), coleta criteriosa e completa dos dados da população estudada (se possível, de todos os casos notificados no período do estudo), análise dos fatores de risco associados à transmissão recente e escolha da técnica molecular a ser utilizada (FOK et al., 2008; HOUBEN; GLYNN, 2009).

Diversos estudos de transmissão avaliaram a proporção de casos de TB atribuídos à transmissão recente. Esta proporção variou de 30-50% dos casos em locais como Holanda, Dinamarca e Nova Iorque (Van SOOLINGEN et al., 1999; GENG et al., 1999; ALLAND et al., 1994; BISHAI et al., 1998), a apenas 16-19% dos casos na Noruega, São Francisco e Alabama (Van SOOLINGEN, 2001; JASMER et al., 1999; KIMERLING et al., 1998). Outros estudos avaliaram a incidência de casos agrupados em *clusters* em uma população (JASMER et al., 1999; MURRAY; NARDELL, 2002). Em São Francisco, por exemplo, a diminuição na taxa de incidência de casos em *clusters* de 10,4/100.000 habitantes em 1991 para 3,8 casos /100.000 habitantes em 1997, mostrou haver uma tendência clara à redução da transmissão recente neste período (JASMER et al., 1999). Taxas de transmissão recente entre diferentes grupos étnicos ou entre grupos de imigrantes em

determinados países também podem ser estabelecidas (HEATH et al., 1998; BORGDORFF et al., 1998). No Brasil, poucos estudos consistentes foram realizados avaliando a dinâmica da transmissão da doença. Em São Paulo, foram realizados estudos para se determinar a incidência, os fatores de risco e os padrões de transmissão da TB multiresistente (TELLES et al., 2005) assim como para se estudar o padrão de transmissão da doença em pacientes infectados e não-infectados pelo HIV (FERRAZOLI et al., 2000).

Desde o início dos anos 90, o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) tem sido o método mais amplamente utilizado em estudos de epidemiologia molecular da tuberculose (HOUBEN; GLYNN, 2009). Esta técnica se baseia na detecção da sequência de inserção 6110 (IS6110) (McADAM et al., 1990). A distribuição desta sequência de inserção, em geral, é aleatória ao longo do genoma e o número de cópias da IS6110 é espécie- e cepa-dependente, podendo variar de clones raros, que não possuem nenhuma inserção (van SOOLINGEN et al., 1993), àqueles que possuem até 26 cópias, sendo que a maior parte dos isolados de *M. tuberculosis* possui entre 8 e 15 cópias (KANDUMA et al., 2003).

A técnica de RFLP é altamente discriminatória e reprodutível (van SOOLINGEN et al., 2001) e a IS6110 é estável o suficiente para distinguir isolados epidemiologicamente relacionados daqueles que não apresentam relação epidemiológica aparente. Um estudo realizado por de Boer et al. (1999) mostrou que, em média, metade das cepas de *M. tuberculosis* apresentam mudança de uma banda em seus perfis genéticos em um período de 3-4 anos. Este período é considerado rápido o suficiente para que isolados de pacientes sem nenhuma relação epidemiológica apresentem perfis genéticos distintos e, por outro lado, lento o suficiente para que isolados de casos epidemiologicamente relacionados apresentem perfis genéticos idênticos.

Entretanto, apesar de ser o método mais utilizado em todo o mundo, a análise de perfis genéticos com menos de 5 cópias do IS6110 não é considerada suficientemente discriminatória. Nestes casos, os isolados devem ser testados por um método de tipagem molecular adicional, que combinado ao RFLP eleve a capacidade discriminatória desta análise.

Uma das técnicas moleculares mais utilizadas em combinação com o RFLP para a análise de isolados com menos de 5 cópias do IS6110 é o *Spoligotyping* (Spacer Oligonucleotide Typing) (BAUER et al., 1999; SUFFYS et al., 2000; van SOOLINGEN, 2001). Apesar de apresentar menor poder de discriminação que o RFLP quando utilizada isoladamente - uma vez que linhagens com diferenças no perfil do marcador genético RFLP-IS6110 podem exibir perfis idênticos de *spoligotyping* (DIAZ et al., 1998) - esta é uma técnica simples, rápida e reprodutível, que também pode ser utilizada como método de tipagem do complexo *M. tuberculosis*.

O *Spoligotyping* se baseia na amplificação da região DR (*Direct Repeat*), pela PCR, e subsequente hibridização diferencial dos produtos amplificados com oligonucleotídeos, complementares às regiões espaçadoras variáveis localizadas entre as DRs. Estes nucleotídeos são imobilizados em uma membrana de *nylon*, onde 43 dessas seqüências espaçadoras são previamente sensibilizadas. O polimorfismo dessa região, nas diferentes amostras, é provavelmente produto de uma recombinação homóloga do DR distante ou adjacente, assim como as mudanças causadas pela localização da IS6110.

Os spoligotipos comuns a mais de um isolado são designados como *Shared Types* (ST) e a eles é atribuído um número "*Shared International Type*" (SIT), de acordo com o banco de dados internacional SpolDB4 (SOLA et al., 2001). Este banco de dados contém uma análise filogenética e a distribuição global de spoligotipos identificados no mundo inteiro classificados em famílias e subfamílias, sendo as principais: a Central-Asian (CAS), East-African-Indian (EAI), Haarlem (H), Latin-American and Mediterranean (LAM), família S, família X (que apresenta poucas cópias de IS6110) e família T (BRUDEY et al., 2006). Isso torna possível a comparação entre os padrões de spoligotipos encontrados em diferentes regiões e, conseqüentemente, um melhor entendimento da dinâmica de distribuição da doença.

Estudos mostram existir relação entre determinadas famílias e características clínico-epidemiológicas da doença. Um exemplo seria a família Beijing, associada a formas mais graves de TB e a uma maior taxa de recidiva/falha terapêutica (GLYNN

et al., 2002; LAN et al., 2003). As famílias Beijing/W e Haarlem também foram associadas à resistência a drogas anti-TB (EU, 2006; MARAIS et al., 2006).

A família LAM é a linhagem mais prevalente no mundo inteiro, sendo responsável por aproximadamente 15% dos casos de tuberculose.

## **1.5 Geoprocessamento e Análise Espacial**

O desenvolvimento e a recente popularização da tecnologia de informática tornou possível o armazenamento e a representação de informações geográficas em ambiente computacional, abrindo espaço para o surgimento do Geoprocessamento. Segundo Rodrigues (1993), o Geoprocessamento é um conjunto de tecnologias de coleta, tratamento, manipulação e apresentação de informações espaciais, voltado para um objetivo específico.

As principais ferramentas computacionais para o Geoprocessamento, chamadas Sistemas de Informação Geográfica (SIG), permitem a realização de análises complexas ao integrar dados de diversas fontes e criar bancos de dados georeferenciados, além de tornarem possível a automatização da produção de materiais cartográficos.

São inúmeras as áreas que se beneficiam das técnicas de geoprocessamento. Elas têm em comum o interesse por entes de expressão espacial, sua localização ou distribuição, ou ainda a distribuição espacial de seus atributos. Sua aplicação em saúde pública tem sido fundamental no estudo de uma grande variedade de doenças infecciosas. Um estudo em Bangladesh identificou fatores de risco espaciais para a infecção por cólera como, por exemplo, a proximidade a fontes de água (ALI et al., 2002). Os SIG também podem ser utilizados para conduzir análises espaciais e temporais para detecção de *clusters* de casos como descrito por Kulldorff e Nagarwalla (1995).

A utilização dos SIG tem sido importante no estudo da distribuição dos casos de tuberculose e na identificação de fatores de risco associados à infecção ou

transmissão desta doença. Os fatores de risco avaliados incluem tanto aspectos clínico/demográficos quanto espaciais.

Em Baltimore, após uma análise molecular e geográfica dos casos de TB, observou-se que as residências de indivíduos que apresentavam isolados com perfis moleculares idênticos estavam espacialmente agregadas em áreas associadas a um nível sócio-econômico baixo e altas taxas de crime e violência (BISHAI et al., 1998). Em Cape Town, na África do Sul, uma análise espacial mostrou que a grande maioria dos casos de TB notificados, estavam distribuídos ao redor de bares locais (MUNCH et al., 2003). Estes dados sugerem que estes bares são locais importantes de transmissão da doença, talvez por representarem áreas que funcionam como ponto de encontro de indivíduos que apresentam maior risco de infecção por TB devido ao seu estilo de vida. Entretanto, este estudo não envolveu a análise molecular dos isolados de *M. tuberculosis* e, portanto, não foi possível determinar se estes representavam realmente casos de transmissão recente. Em um estudo espacial realizado em Vitória (MACIEL et al., 2010), foram identificadas áreas com altas taxas de incidência de TB. Observou-se haver associação entre estes locais e o status socioeconômico dos pacientes. Por outro lado, nem todas as áreas que apresentaram alta incidência da doença correspondiam a áreas de pobreza, sugerindo que outros fatores devem estar associados à transmissão. Entretanto, este estudo também não envolveu a análise dos perfis moleculares dos isolados, o que poderia ter auxiliado na resposta a estas questões.

## **1.6 Justificativa**

A identificação dos padrões genotípicos das cepas de *M. tuberculosis* de uma determinada população e sua distribuição podem ser utilizadas como base em estudos de epidemiologia molecular incluindo estudos de transmissão, identificação de surtos, discriminação entre recidiva e reinfecção, contaminação intralaboratorial, entre outros.

Diversos estudos populacionais de epidemiologia molecular vêm sendo conduzidos com o objetivo de se estimar as taxas de transmissão recente e reativação endógena da TB, além de identificar e caracterizar os padrões de transmissão

recente em diferentes regiões e fatores de risco a ela associados. Como descrito anteriormente, estes estudos se baseiam fundamentalmente nas comparações entre os perfis genéticos de isolados de TB de diferentes pacientes. Perfis agrupados em *clusters* sugerem o envolvimento destes pacientes em cadeias de transmissão recente, enquanto padrões únicos indicam reativação endógena (van SOOLINGEN, 2001; NAVA-AGUILERA et al., 2009).

Apesar de 80% dos casos de TB notificados no mundo estarem concentrados em apenas 22 países, recentes artigos de revisão e meta-análise mostram que a grande maioria destes estudos tem sido realizada em países desenvolvidos, onde a incidência da TB é baixa, fator que influencia os padrões de transmissão da doença nestes locais (HOUBEN; GLYNN, 2009; FOK et al., 2008; NAVA-AGUILERA et al., 2009). É, portanto, de fundamental importância que estes estudos sejam realizados em países ou distritos com alta incidência de TB, onde a dinâmica da transmissão e os fatores de risco a ela associados provavelmente apresentam padrões bem distintos daqueles observados em áreas de baixa incidência.

Nesse sentido, o município de Vitória, por estar localizado em uma área geograficamente bem delimitada, possuir um Banco de Dados Georreferenciado, e representar um local de alta incidência de TB, reúne as características adequadas para a realização de um estudo sobre a dinâmica da transmissão desta doença.

O Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo (NDI/UFES), é referência na realização de ensaios clínicos diagnósticos e terapêuticos em TB. Foi pioneiro na criação de uma rede de laboratórios vinculados a diferentes instâncias (municipal, estadual e federal) e a implementar a cultura universal de escarro para o diagnóstico da tuberculose, além de disponibilizar um banco de dados laboratorial de TB com mais de 200.000 pacientes cadastrados, facilitando o acesso a informações clínicas e epidemiológicas destes pacientes. Um estudo multicêntrico de avaliação do encurtamento do tratamento anti-TB (JOHNSON et al., 2009) realizado neste laboratório mostrou que, apenas 10% dos pacientes avaliados nesse *site* relataram contato prévio com caso suspeito de tuberculose (dados não publicados). Estes resultados confirmam a suspeita de que, na grande maioria das vezes, a transmissão ocorre fora do

domicílio, como consequência de contatos breves e casuais entre estes indivíduos e seus casos índices. Estes dados evidenciam a limitação do PCT que utiliza, como uma das estratégias de controle da TB, apenas a busca pelos contatos de pacientes que procuram espontaneamente o serviço de saúde.

Os resultados do presente estudo poderiam ser utilizados pela coordenação do Programa de Tuberculose do Município como uma ferramenta na tomada de decisões acerca do planejamento de estratégias de controle e prevenção da doença de forma mais efetiva. Esta medida foi adotada pelos Estados Unidos, onde o PCT foi reavaliado com base nos resultados obtidos por Golub e colaboradores (2001) em seu estudo sobre a dinâmica da transmissão da doença (SCHURCH; Van SOOLINGEN, 2012).

Caso nossas expectativas sejam confirmadas, este modelo poderá ser validado em regiões metropolitanas com características semelhantes às de Vitória, para então ser discutido no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Isto significa dizer que esses dados poderão confirmar a estratégia de busca de contatos atualmente vigente ou modificá-la, expandindo a busca por contatos para além dos domicílios. Outra aplicação importante desta estratégia seria a sua utilização no controle da transmissão de cepas multi-droga resistente do *M. tuberculosis*. Diante do exposto, acreditamos que nossos resultados irão servir de subsídio ao aperfeiçoamento da Política Nacional de Saúde, no que diz respeito ao Modelo de Atenção, na apropriação/incorporação dos resultados pelos serviços de controle da tuberculose, na melhoria da Gestão, Organização e Qualidade dos Serviços, na redução da morbi-mortalidade relacionada à tuberculose e na incorporação de tecnologias e novos processos de atenção para o controle da tuberculose.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Analisar a dinâmica da transmissão de *Mycobacterium tuberculosis* no município de Vitória – ES – Brasil, no período de 2003 a 2007, a partir da análise de dados genotípicos e espaciais.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 1) Caracterizar o perfil genotípico das cepas de *M. tuberculosis* circulantes no município de Vitória-ES, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2007, com base em diferentes métodos de análise molecular;
- 2) Determinar a taxa de transmissão recente e reativação endógena na população de pacientes arrolados no estudo;
- 3) Identificar as áreas de maior ocorrência de transmissão recente da TB com base em análises espaciais;
- 4) Identificar os fatores de risco associados à transmissão recente da TB com base em análises estatísticas e espaciais.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi caracterizado como um estudo de caso-controle espacial e foi conduzido no Laboratório de Micobacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo. Este laboratório realiza Ensaio Clínicos e todas as suas atividades são conduzidas obedecendo às normas de Boas Práticas Clínicas e Laboratoriais.

#### **3.1 Caracterização da amostra**

De acordo com dados obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2007, um total de 836 casos de tuberculose foram notificados no município de Vitória, capital do estado do Espírito Santo, Brasil.

Deste total de casos, 302 (36,1%) pacientes foram excluídos por: (i) terem sido notificados com base apenas na clínica compatível com TB, (ii) apresentarem resultados de cultura negativos e/ou (iii) não residirem no município de Vitória. Uma vez que para a realização do estudo seriam realizadas análises moleculares dos isolados de *M. tuberculosis*, foram selecionados os 534 (63,8%) pacientes restantes, que apresentavam resultados de cultura positivos para micobactérias e residiam no município de Vitória. Destes, quatorze isolados foram excluídos da análise por terem sido notificados em mais de um ano do estudo e apresentarem o mesmo perfil genético nos isolados analisados, fato que exclui a possibilidade de reinfecção. Outros 17 pacientes foram excluídos da análise devido ao não crescimento ou contaminação das culturas de seus isolados em meio sólido, perfazendo um total de 503 pacientes analisados ao final deste estudo. A média de idade dos pacientes foi de 38,2 anos (1-88 anos) e 356 (70.7%) pacientes eram do sexo masculino.

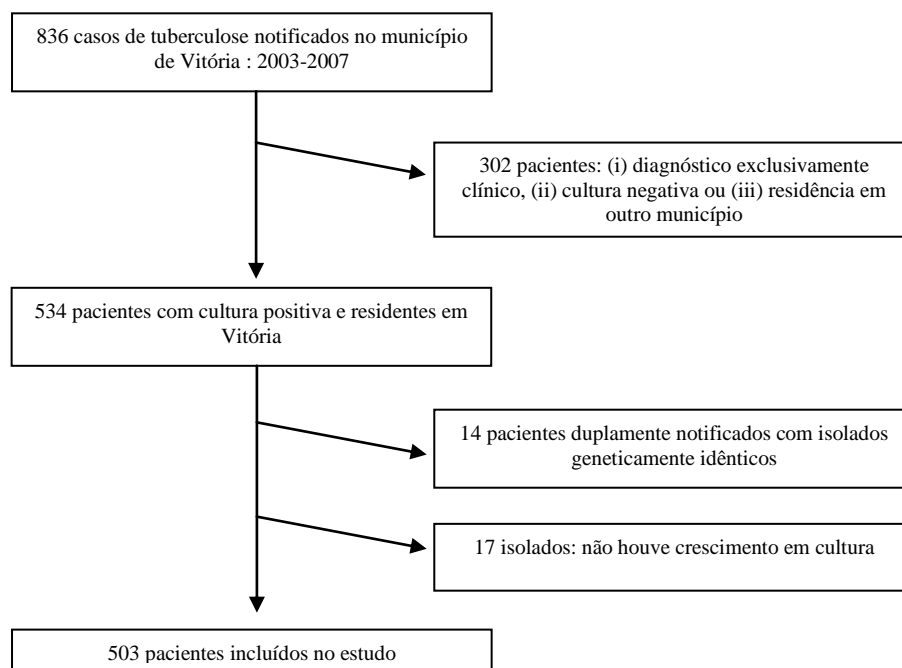


Figura 1 – Fluxograma dos pacientes incluídos na população de estudo

### 3.2. Identificação dos isolados de culturas positivas

Todas as cepas selecionadas para este estudo foram identificadas como *M. tuberculosis* com base nas características fenotípicas das colônias (rugosas, cremes e opacas), na sensibilidade ao  $\rho$ -nitro- $\alpha$ -acetilamino- $\beta$ -hidroxipropiofenona (NAP) e/ou ao ácido  $\rho$ -nitrobenzóico (500 $\mu$ g/ml) e na resistência à hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (2 $\mu$ g/ml) (KENT; KUBICA, 1995; COLLINS et al., 1997).

### 3.3. Subcultivo das cepas

No Laboratório de Micobacteriologia do NDI, todas as cepas, já identificadas, são armazenadas em meio líquido 7H9/glicerol 10%, a uma temperatura de aproximadamente  $-70^{\circ}\text{C}$ . As cepas selecionadas para a análise molecular foram descongeladas à temperatura ambiente, subcultivadas em dois frascos contendo meio de Ogawa e incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após o crescimento das colônias, um dos frascos foi utilizado para posterior recongelamento da cepa, enquanto o outro foi utilizado para proceder a extração do DNA.

### **3.4. Técnicas de Tipagem molecular:**

#### **3.4.1. Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP-IS6110**

Para todos os isolados do estudo, foi utilizada a técnica de RFLP para análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA gerados após digestão com enzimas de restrição. Esta técnica foi realizada de acordo com o método descrito por Van Embden e colaboradores (1993).

##### **3.4.1.1. Extração e purificação do DNA bacteriano**

Uma porção das colônias dos isolados de *M. tuberculosis* foi transferida para microtubos contendo 400 µl de tampão TE 1X e incubada a 80°C por 20 minutos. Foram adicionados 50 µl da solução de lisozima e os tubos incubados a 37°C por 2 horas. Adicionou-se 75 µl da solução de proteinase K/SDS 10% a cada tubo, e estes foram incubados a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados aos tubos 100 µl de NaCl 5M e 100 µl da solução CTAB/NaCl, e estes foram incubados a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 750 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), e as preparações foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos. A fase superior foi transferida para microtubos esterilizados e adicionados 450 µl de isopropanol. Após precipitação do DNA a -20°C por aproximadamente 18 horas, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 500 µl de etanol 70% por centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. Após lavagem, o sobrenadante foi descartado e a secagem realizada à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 25 µl de solução tampão TE, refrigerado por 2 horas e, em seguida, armazenado a -20°C.

##### **3.4.1.2. Quantificação e digestão**

Para determinar a concentração de DNA, 1 µl das amostras foi diluído em 99 µl de água esterilizada e submetido à leitura da absorbância em espectrofotômetro específico (NanoDrop 1000, Nanodrop Technologies). Para clivagem do DNA, aproximadamente 3 µg das mesmas foram transferidas para microtubos contendo 5

unidades (U) da enzima de restrição *Pvu* II (Invitrogen), 2 µl da solução tampão específica (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1mM, pH 7,9) e um volume de água purificada esterilizada para um volume final de 20 µl. Os tubos foram incubados a 37°C por uma hora.

#### **3.4.1.3. Separação e transferência para membrana**

A separação por eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,0% (20 X 20 cm) a 50 volts durante um período de aproximadamente 14 horas. O DNA foi depurinado submergindo-se o gel em solução de HCl 0,25 M durante 10 minutos e, em seguida, lavando-o em água destilada. O DNA foi desnaturado pelo tratamento com solução de NaOH 0,4 M por 20 minutos e o gel foi lavado em água destilada. As etapas de desnaturação e lavagem foram repetidas. Finalmente, foi feita a transferência dos fragmentos de DNA separados no gel de agarose para uma membrana de náilon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham), por aproximadamente 1 hora, à vácuo, utilizando-se o aparelho Vacuum Blotter (Bio-Rad).

#### **3.4.1.4. Preparo e marcação da sonda de DNA**

O DNA utilizado para preparo da sonda consiste em uma seqüência de 245 pb do elemento de inserção *IS6110* e foi preparado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos iniciadores: INS1 (5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC) e INS2 (5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA) como descrito por Van Embden e colaboradores (1993). Após o preparo, a sonda foi marcada com peroxidase de acordo com as recomendações do kit ECL<sup>TM</sup> RPN 3000 (Amersham).

#### **3.4.1.5. Hibridação do DNA bacteriano com a sonda de DNA marcada**

As membranas contendo os fragmentos de DNA foram colocadas em tubos de vidro específicos, pré-hibridadas por uma hora a 42°C e, em seguida, foram adicionados 10 ml de tampão de hibridação contendo 10 ng da sonda de DNA marcada e previamente desnaturada. Após hibridação a 42°C por 16-18 horas, as membranas foram lavadas quatro vezes. As duas primeiras lavagens foram realizadas com

SSC/DSS previamente aquecido a 55°C, por 10 minutos e as demais lavagens foram realizadas com SSC 2X à temperatura ambiente por 5 minutos.

#### **3.4.1.6. Detecção**

Um volume de 3 ml do reagente de detecção 1 foram misturados ao mesmo volume do reagente de detecção 2, ambos fornecidos pelo kit. A membrana foi banhada com esta solução de detecção por 1 minuto. Posteriormente, retirou-se o excesso de líquido da membrana em papel de filtro, e esta foi colocada no cassete, com a face contendo DNA voltada para cima. Sobre a membrana, foi colocado um filme de Rx (Biomax ML-Kodak) e o cassete foi fechado por 1 minuto. Em seguida, o filme foi imerso por 1 minuto em solução reveladora e lavado em água corrente. Após a lavagem, o filme foi imerso por 1 minuto em solução fixadora e lavado novamente. Todos estes procedimentos foram realizados em uma sala escura.

#### **3.4.1.7. Análise do perfil genotípico dos isolados**

As auto-radiografias foram escaneadas para um computador e analisadas pelo software BioNumerics, version 4.5-2005 (Applied Maths – Bélgica). Os isolados que apresentaram perfis moleculares idênticos foram agrupados em *clusters*. Os *clusters* cujos padrões de RFLP apresentavam similaridade maior que 80% entre si foram considerados como pertencentes a uma mesma “família” de RFLP. Aqueles que apresentaram perfis distintos foram classificados como padrões únicos (PU). Os isolados que apresentaram perfis com menos de 5 cópias do IS6110, foram identificados como *clusters* ou PUs apenas após a realização da técnica de *Spoligotyping* para confirmação dos resultados.

#### **3.4.2. Análise da região “Direct Repeat” (DR) – (*Spoligotyping* – Spacer Oligonucleotide Typing):**

Esta técnica será utilizada para analisar o polimorfismo resultante da amplificação da região DR de todos os isolados do estudo, como descrito por Kamerbeek e colaboradores (1997).

#### **3.4.2.1 Amplificação da região DR:**

Além dos isolados de *M. tuberculosis* dos pacientes, foram utilizados 20 ng de DNA das cepas *M. tuberculosis* H37 Rv e *M. bovis* BCG como controle do experimento.

Foi realizada uma PCR utilizando 20 pmol dos iniciadores DRa 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3' – biotinilado e DRb 5' GGT TTT GGG TCT GAC GAC 3', 0,2mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> , perfazendo um volume total de 60ul.

O programa de amplificação consistiu de desnaturação inicial do DNA a 96°C por 3 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

#### **3.4.2.2. Hibridização com a membrana e revelação:**

Trinta microlitros do produto da PCR foram diluídos em 150 µL de 2x SSPE/0,1% SDS, desnaturados a 99°C por 10 minutos e, em seguida, colocados em banho de gelo.

Esta suspensão foi aplicada ao “miniblotter” (MN45, Isogen, Holanda), onde previamente foi montada uma membrana (Isogen, Holanda) contendo as 43 seqüências correspondentes aos espaçadores conhecidos da região DR do *M. tuberculosis*. A hibridação da membrana foi realizada a 60°C por 60 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com 2x SSPE/0,1%SDS e incubada com um conjugado estreptavidina-peroxidase a 42°C por 45 - 60 minutos.

A membrana foi lavada duas vezes com 2x SSPE/0,5% SDS a 42°C por 10 minutos, seguida por mais 2 lavagens com 2x SSPE a temperatura ambiente. Posteriormente, foi tratada com volumes iguais de reagente de detecção 1 (peroxidase) e reagente de detecção 2 (luminol) (Kit ECL) e sobreposta por um Hyperfilm ECL por um período de 2 horas. Este filme foi revelado como descrito em 3.5.1.7.

### 3.4.2.3. Análise dos resultados:

Após a revelação, os sinais obtidos com os 43 espaçadores para cada isolado foram transformados em formato binário (0 = falta de sinal e 1 = presença de sinal). Spoligotipos comuns a mais de um isolado foram designados *Shared Type* (ST) e foi atribuído a cada um deles, um número “*Shared International Type*” (SIT) de acordo com a base de dados internacional SpolDB4 (BRUDEY ET AL., 2006) atualizada (DEMAY et al., 2012) – SITVITWEB – disponível em <[http://www.pasteur-guadalupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/](http://www.pasteur-guadalupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)>. Dessa forma, os spoligotipos foram agrupados em famílias e subfamílias. Os spoligotipos não relatados no SpolDB4 foram denominados “orphans” e o banco de dados Spotclust (VITOL et al. 2006) foi utilizado para verificar a porcentagem de similaridade destes com as famílias/subfamílias já descritas.

A taxa de transmissão recente foi estimada utilizando-se o “método n-1”, segundo a fórmula  $(T(c) - n(c))/T(a)$ , onde  $T(c)$  é o número total de isolados agrupados em *clusters*,  $n(c)$  é o número de *clusters*, e  $T(a)$  é o número total de isolados. (NAVA-AGUILERA et al., 2009).

## 3.5. Construção da Base de Dados

A base de dados pretende relacionar bancos com informações demográficas, socioeconômicas, clínicas, bacteriológicas e moleculares.

Os dados clínicos e demográficos foram obtidos da ficha de Notificação do SINAN e do censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano 2000. As variáveis individuais analisadas foram: sexo, faixa etária, raça/cor, escolaridade, raio X de tórax, forma clínica da TB, infecção por HIV e resultado da baciloscopia. As variáveis socioeconômicas obtidas a partir dos dados do censo foram agrupadas por bairro e incluíram: número de domicílios com renda mensal superior a 10 salários mínimos, número de domicílios com renda mensal inferior a 10 salários mínimos, renda mensal do responsável pelo domicílio, número de responsáveis por domicílios com renda mensal de até meio salário mínimo, número

de domicílios próprios, número de domicílios com banheiro e esgotamento sanitário via rede geral de esgoto, número de domicílios com energia elétrica, número de pessoas alfabetizadas por residência, área urbanizada de cidade, Índice de Qualidade Urbana (IQU) e densidade populacional.

### 3.6 Análise Espacial

Os dados genotípicos foram utilizados para a realização da análise espacial que teve como objetivo identificar se os *clusters* genotípicos (casos) também se organizavam como *clusters* ou conglomerados espaciais e quais os fatores de risco estariam associados à transmissão recente nessas áreas.

#### 3.6.1 Distribuição espacial dos casos e controles

Os locais de residência dos pacientes foram verificados e georeferenciados utilizando-se como ferramenta o programa Google Earth para obtenção das coordenadas latitude e longitude. Utilizando-se a malha digital do município de Vitória fornecida pela Secretaria Municipal da Fazenda (SEMFA) e os dados georeferenciados, foi possível construir um mapa de pontos que permite a visualização da distribuição espacial dos casos e controles.

#### 3.6.2 Estimativa de densidade de Kernel (*Kernel Density Estimation* - KDE)

A KDE é uma técnica estatística, de interpolação, não paramétrica, em que uma distribuição de pontos é transformada em uma superfície de densidade para a identificação visual de áreas que apresentam uma concentração de eventos, indicando aglomeração em uma distribuição espacial. É uma função que realiza uma contagem de todos os pontos dentro de uma região de influência, ponderando-os pela distância de cada um à localização de interesse (Câmara et al., 2002). Sua fórmula geral em um espaço bi-dimensional é:

$$\lambda(s) = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\pi r^2} k\left(\frac{d_{is}}{r}\right),$$



onde  $\lambda$  é a densidade na localização  $s$ ,  $r$  é o raio de influência que define a vizinhança do ponto a ser interpolado,  $n$  é o número de eventos,  $k$  é o peso de um ponto  $i$  a uma distância  $d_{is}$  de uma localização  $s$ .

Muitas vezes, ocorre a sobreposição de vários eventos na mesma localização. Este fenômeno não é percebido ao se visualizar um mapa de pontos, mas é levado em consideração no mapa de Kernel para cálculo da densidade de ocorrência. Por esse motivo, uma KDE Gaussiana foi utilizada nesse estudo para determinar quais as áreas de maior concentração de isolados em *cluster* (transmissão recente).

### 3.6.3 Função K de Ripley

A função K,  $K(t)$  é dada pela fórmula

$$K(t) = \lambda^{-1} E[N_0(t)],$$

onde  $N_0(t)$  é o número de eventos distante menos de  $t$  de um evento arbitrário. Esta função é mais comumente estimada utilizando-se a correção do efeito de borda proposta por Ripley ([Diggle 2003](#)).

Para a função K de Ripley, a hipótese nula é de Completa Aleatoriedade Espacial (CAE), para função univariada (BATISTA, 1994). Para este estudo, a CAE foi testada através de envelopes de confiança construídos através 1.000 simulações Montecarlo, produzindo envelopes de confiança de 95%. A análise da CAE é feita de forma gráfica para facilitar a visualização dos desvios em relação à hipótese nula (RIPLEY, 1979). Se os valores observados estiverem dentro dos envelopes construídos, o padrão espacial é aleatório e, para valores fora dos envelopes, rejeita-se a hipótese nula. Se os valores forem positivos, o padrão é agregado, e se forem negativos, o padrão é regular.

A análise por função K de Ripley foi utilizada para avaliar a ocorrência de agrupamento (*clusterização*) espacial. Devido ao maior impacto causado na cadeia de transmissão da doença, foram escolhidos, inicialmente, os cinco maiores *clusters*

para a realização desta análise. Posteriormente, a *clusterização* espacial das respectivas famílias de RFLP também foi avaliada por esta metodologia.

#### **3.6.4 Análise da média das distâncias entre pontos pelo Teste *t*-Student.**

O Teste *t*-Student foi utilizado para o cálculo da média das distâncias entre pontos (representando o local de residência de cada paciente), para avaliação da ocorrência de *clusterização* espacial. Para esta análise, foi calculado um centróide (centro geométrico de uma área) para os pontos de cada *cluster* e, posteriormente, as distâncias do local de residência de cada integrante da respectiva família de RFLP foram medidas (em metros) em relação a esse centróide.

Uma segunda análise foi realizada, comparando-se a média das distâncias entre os locais de residência dos pacientes pertencentes a cada uma das famílias de RFLP com a média das distâncias entre os locais de residência dos pacientes pertencentes ao grupo controle.

#### **3.6.5 Análise estatística espacial – Modelo *logit***

Os pacientes incluídos no estudo foram divididos em dois grupos: pacientes com isolados de *M. tuberculosis* pertencentes a um mesmo *cluster* foram definidos como casos, enquanto pacientes infectados por padrões únicos de isolados foram definidos como controles.

As análises estatísticas univariada e multivariada utilizadas para avaliação dos fatores de risco associados à transmissão recente (pertencer a um *cluster*) foram realizadas por intermédio de um Modelo *logit* com efeito randômico de vizinhança. Apenas as variáveis que foram significativamente associadas à transmissão recente ( $p \leq 0.05$ ) pela análise univariada foram incluídas na análise multivariada. A escolha do modelo estatístico envolveu a inclusão de todas essas variáveis, seguida da remoção sequencial daquelas que não contribuíram para o ajuste do mesmo. O efeito randômico para cada vizinhança foi a variável de saída (*output*) definida para cada bairro, sendo que valores positivos do estimador log-odds (*logit*) indicam maior chance de pertencer a um *cluster*. Os valores do estimador log-odds foram

convertidos em um valor de probabilidade preditiva por meio da fórmula  $\text{prob} = 1 / (1 + \exp(-RE))$  e esse valor foi mapeado.

Para realização das análises estatísticas foi utilizada a versão 3.0.2 do *software* R (The R Foundation for Statistical Computing).

### **3.7 Considerações Éticas**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFES – Brasil sob o número 121/06.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise do perfil genotípico dos isolados de *M. tuberculosis*

Após a análise molecular dos perfis genéticos dos isolados obtidos através da realização da técnica de RFLP, observou-se que, dos 503 pacientes incluídos no estudo, 242 (48,1%) foram agrupados em 70 diferentes *clusters* por possuírem isolados com um padrão genético idêntico ao de, pelo menos, um outro paciente do estudo. Foram identificadas 12 “famílias”, sendo que 4 delas (famílias 1, 6, 14 e 19) incluem 133 isolados, representando 54,9% dos isolados em *cluster* e 26,4% de todos os isolados do estudo (Figura 2).

O tamanho dos *clusters* identificados variou de 2 a 17 isolados. A maioria dos *clusters* (52,9%) possui apenas dois isolados cada, 41,4% correspondem a *clusters* médios (contendo 3 – 8 isolados cada) e 5,7% a grandes *clusters* (contendo 9 ou mais isolados cada) (Figura 3). Do total de isolados, 14,71% (74/503) foram agrupados em pequenos *clusters*, 75,34% (118/503) em *clusters* médios e 9,94% (50/503) nos maiores *clusters* (Figura 4), ou seja, apesar de existirem em maior número, as cadeias de transmissão envolvendo apenas 2 indivíduos contribuem em menor escala para o processo de transmissão recente.

Os 261 (51,9%) pacientes restantes foram denominados PU por apresentarem isolados com padrões genéticos únicos. Entretanto, é importante ressaltar que 56,3% destes isolados apresentaram perfis de RFLP muito semelhantes ao perfil de pelo menos um dos *clusters* identificados no estudo (similaridade superior a 80%) e pertenciam à mesma família de *spoligotyping* dos mesmos. Por esse motivo, foram agrupados na respectiva família de RFLP para fins de análise.

Com base nos perfis genotípicos avaliados, foi possível estimar a taxa de transmissão recente no município de Vitória em 34,2% ([242-70]/503) utilizando-se o “método n-1”. A análise desses perfis também permitiu determinar a proporção de transmissão intradomiciliar em 5,7% (29/503).

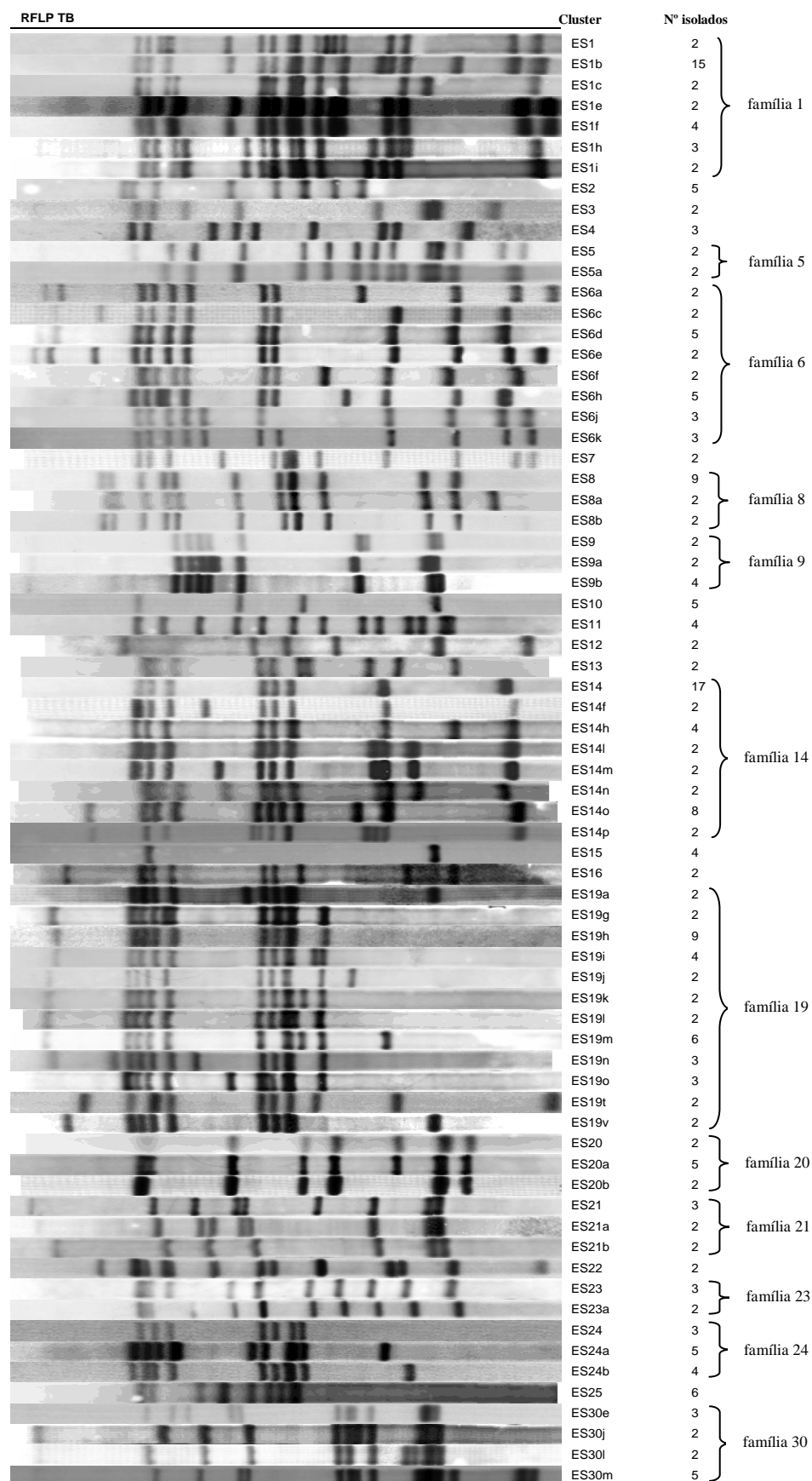


Figura 2 – Perfil genotípico dos 71 *clusters* identificados após análise pelo RFLP

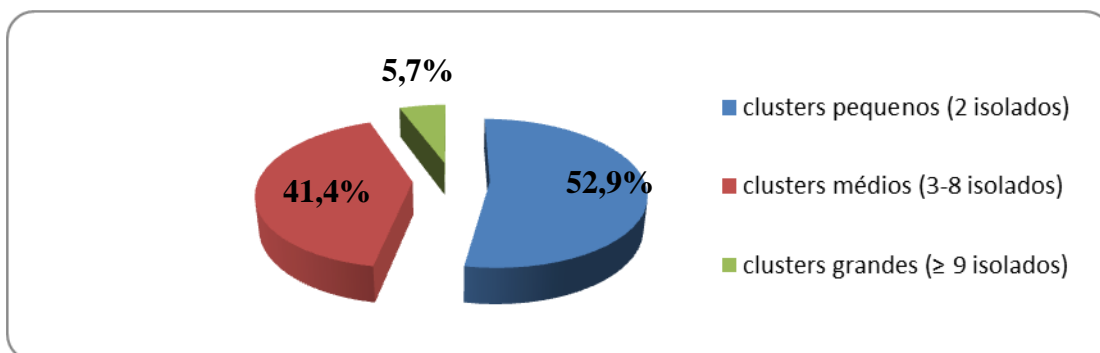


Figura 3 – Caracterização dos *clusters* de acordo com seu tamanho (número de indivíduos em cada *cluster*)

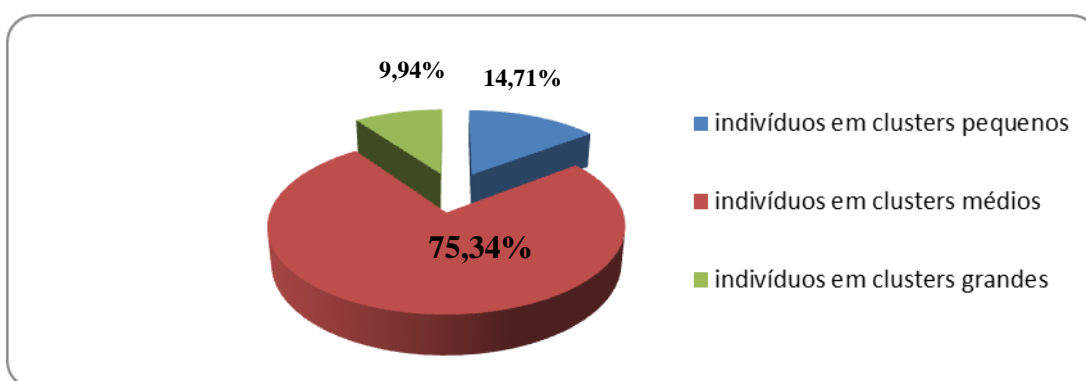


Figura 4 – Porcentagem de indivíduos distribuídos em *clusters* pequenos, médios e grandes

Dos 503 isolados incluídos no estudo, 495 foram analisados pela técnica de *Spoligotyping*. Destes, 424 (85,6%) foram enquadrados nos perfis já descritos pelo banco internacional SpolDB4 e distribuídos em 73 spoligotipos (SITs): 62 perfis compatíveis com SITs preexistentes e 11 perfis com SITs de famílias desconhecidas denominadas “Unknown”. Os 71 isolados restantes (14,4%) foram identificados como “orphan”. Nestes casos, o banco de dados Spotclust foi utilizado para verificar a porcentagem de similaridade dos perfis observados com os perfis de famílias/subfamílias já descritas no SpolDB4 (Tabela 1).

Os isolados analisados foram distribuídos nas seguintes linhagens: Beijing ( $n = 1$ , 0.2%), EAI ( $n = 1$ , 0.2%), Haarlem ( $n = 37$ , 7.5%), LAM ( $n = 285$ , 57.6%), S ( $n = 8$ ,

1.6%), T ( $n = 71$ , 14.3%), X ( $n = 12$ , 2.4%), X1-T5 ( $n = 2$ , 0.4%), T5\_MAD2 ( $n = 2$ , 0.4%), T4-CEU1 ( $n = 6$ , 1.2%), e “unknown” ( $n = 35$ , 7.1%).

A família LAM foi a mais frequente entre as amostras analisadas, seguida das famílias T e H, respectivamente (Tabela 1). Sete SITs acomodaram 44% (217/495) de todos os isolados analisados: SIT42/LAM9 ( $n = 60$ ), SIT17/LAM2 ( $n = 45$ ), SIT33/LAM3 ( $n = 42$ ), SIT20/LAM1 ( $n = 24$ ), SIT53/T1 ( $n = 20$ ), SIT167/T1 ( $n = 12$ ) and SIT47/H1 ( $n = 14$ ).

Para análise dos isolados classificados como orphan, foi utilizado o banco Spotclust para verificar a porcentagem de similaridade dos perfis observados com famílias/subfamílias já descritas. Os perfis foram então distribuídos, de acordo com a similaridade mostrada na Tabela 2, em 6 prováveis famílias e 10 subfamílias (LAM1, LAM3, LAM8, LAM9, T1, T2, EAI1, S, H1 e Family33). Neste caso, a família T foi a mais frequente, representando 17 (42,5%) dos isolados, seguida da família LAM com 15 (37,5%) isolados.

Tabela 1 – Spoligotipos dos isolados que apresentaram perfis já descritos pelo banco internacional SpolDB4

[illegible]



Tabela 1 – Spoligotipos dos isolados que apresentaram perfis já descritos pelo banco internacional SpolDB4 (continuação)

[illegible]



Tabela 2 – Spoligotipos não identificados pelo banco internacional SpolDB4 (orphans)

<b>Perfil binário</b>	<b>Octal</b>	<b>SIT</b>	<b>N isolados</b>	<b>Análise Spotclust</b>
	7777607760731	Orphan	2	LAM1 – probabilidade = 0.688545852832283
	277777607760771	Orphan	2	LAM1 – probabilidade = 0.662535574866542
	776174607760771	Orphan	1	LAM3 – probabilidade = 0.995932099816554
	677677606000171	Orphan	1	LAM8 – probabilidade = 0.993232342617365
	757777600000331	Orphan	2	LAM8 - probabilidade = 0.99943979567009
	577777607560471	Orphan	1	LAM9 – probabilidade = 0.99986286198791
	737777601560771	Orphan	2	LAM9 – probabilidade = 0.992673037845704
	757777601560711	Orphan	1	LAM9 – probabilidade = 0.992631285835824
	757777607560771	Orphan	2	LAM9 – probabilidade = 0.999862869363912
	777737606560771	Orphan	1	LAM9 – probabilidade = 0.999899066973839
	777747607760671	Orphan	1	LAM9 – probabilidade = 0.999739977142833
	777777607760471	Orphan	1	LAM9 – probabilidade = 0.999739977142833
	741703777360771	Orphan	5	T1 – probabilidade = 0.99989444686008
	763777677560771	Orphan	1	T1 – probabilidade = 0.999888355339892
	777737667560771	Orphan	1	T1 - probabilidade = 0.999888341323507
	777777667560771	Orphan	1	T1 - probabilidade = 0.999888342266347
	777777777760661	Orphan	1	T1 – probabilidade = 0.999934433804264
	770777777700000	Orphan	1	T2 – probabilidade = 0.999973607602304
	777677777700000	Orphan	5	T2 – probabilidade = 0.999973823912893
	777777604100000	Orphan	2	T2 – probabilidade = 0.953279322886846
	777737607400000	Orphan	3	EAI1 – probabilidade = 0.994856308917271
	777777607000000	Orphan	1	EAI1 – probabilidade = 0.999861311717061
	776377773740731	Orphan	1	S – probabilidade = 0.810540985233088
	1777774020771	Orphan	1	H1 – probabilidade = 0.999963694196914
	41007000144771	Orphan	2	Family33 – probabilidade = 0.480616355419254

## 4.2. Análise Espacial

O mapa de densidade de Kernel mostra três áreas bem definidas (cor branca) nas regiões central, oeste e sudoeste, onde existe uma maior concentração de casos de transmissão recente da TB (Figura 5a). Essas regiões apresentam em comum, fatores de risco para o desenvolvimento da TB como: baixa renda, favelas e grandes aglomerações. Quando este mapa foi comparado ao mapa da razão entre as taxas bayesianas empíricas de casos e controles, observou-se uma grande concordância na identificação das áreas onde o risco de transmissão recente da TB é maior (Figura 5b).

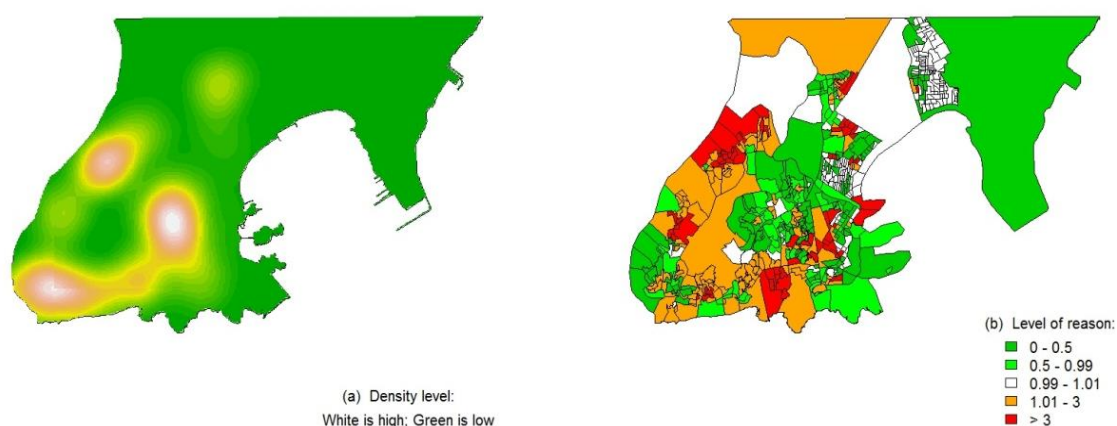


Figure 5 – (a) Mapa de Kernel dos isolados em *clusters* (casos) e (b) razão entre as taxas bayesianas empíricas de casos e controles

A figura 6 mostra os resultados obtidos após a análise por função K realizada para os cinco maiores *clusters* identificados no estudo (ES14, ES14o, Es1b, ES19h and ES8). O eixo-x representa as distâncias entre os pontos e o eixo-y representa o valor de K. Os resultados evidenciam a existência de uma correlação espacial positiva (*clusterização*) para todos os *clusters* avaliados, uma vez que os valores da função K localizam-se fora dos envelopes de confiança, rejeitando-se a hipótese nula de aleatoriedade espacial.

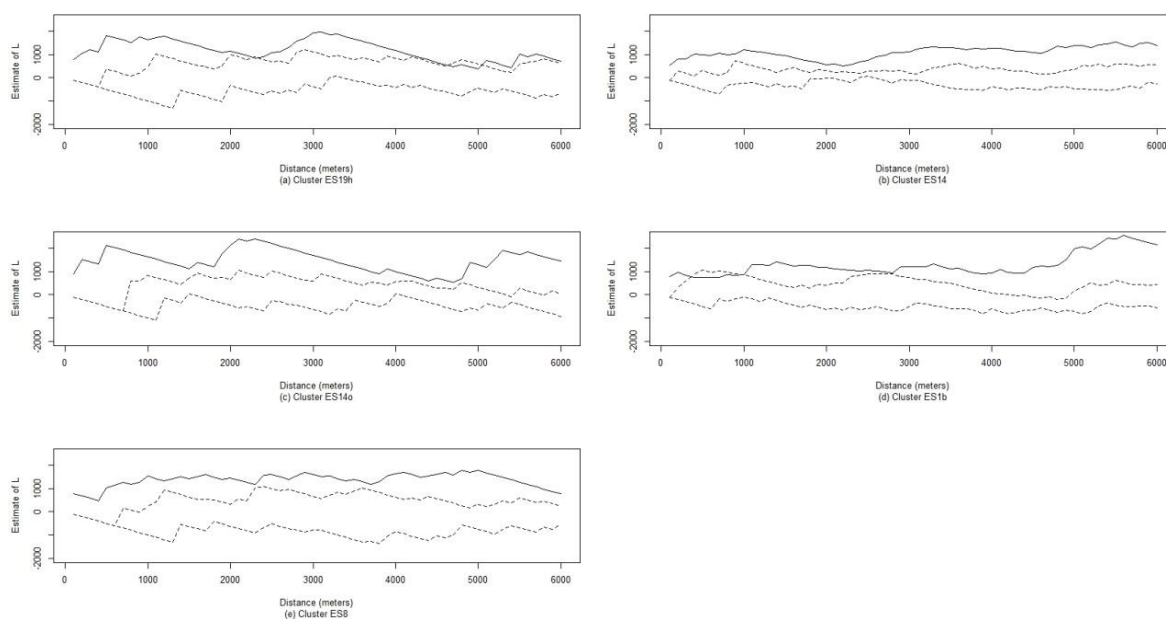


Figure 6 - Análise por função K dos cinco maiores *clusters* identificados no estudo: (a) ES19h, (b) ES14, (c) Es14o, (d) ES1b e (e) ES8. As linhas pontilhadas representam o envelope de confiança de 95% de Completa Aleatoriedade Espacial, enquanto a linha sólida representa os valores obtidos.

Uma análise por função K também foi realizada para avaliar se os isolados das respectivas famílias de RFLP destes *clusters* (ES14, ES1, ES19 e ES8) também apresentavam um padrão de *clusterização* espacial. Foram também incluídos, nesta análise, todos os PUs que apresentaram perfis de RFLP muito semelhantes ao perfil de pelo menos um dos *clusters* identificados no estudo (ou seja, similaridade superior a 80%). Os resultados desta análise também sugerem a existência de uma correlação espacial positiva (*clusterização*) para todas as famílias de RFLP analisadas (Figure 7).

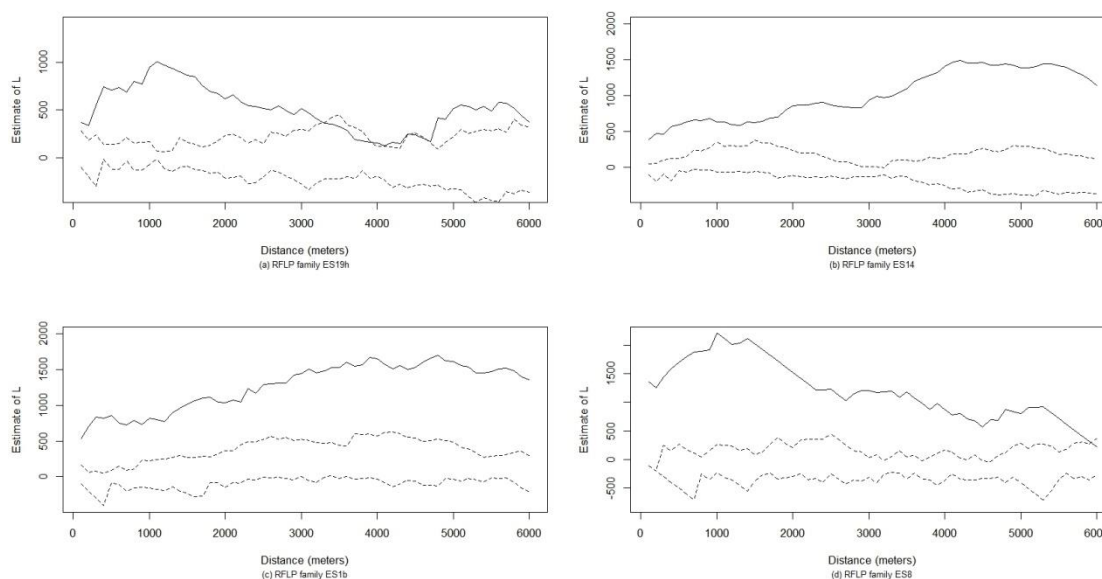


Figura 7: Análise por função K das famílias de RFLP: (a) ES19, (b) ES14, (c) Es1 e (d) ES8. As linhas pontilhadas representam o envelope de confiança de 95% de Completa Aleatoriedade Espacial, enquanto a linha sólida representa os valores obtidos.

A análise da média das distâncias entre pontos utilizando Teste *t*-Student mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre as médias das distâncias dos isolados em *clusters* e as médias das distâncias dos isolados das respectivas famílias de RFLP em relação ao centróide, exceto para o *cluster* ES19h e família ES19. Porém, ao se comparar a média das distâncias entre os isolados pertencentes ao grupo controle e a média das distâncias entre os casos de uma mesma família de RFLP, observa-se diferença estatisticamente significativa. Esses resultados sugerem que os isolados agrupados em *clusters* e suas respectivas famílias tendem a se agrupar no espaço, enquanto os isolados do grupo controle, não parecem seguir o mesmo padrão de distribuição espacial (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação da distância média entre pontos, calculada por teste t-Student, para isolados agrupados em *clusters*, famílias de RFLP e grupo controle.

Distância média entre isolados em <i>clusters</i> e em suas respectivas famílias de RFLP em relação ao centróide			
Grupos comparados	p valor*	Distância média (em metros)	
		Cluster	Família RFLP
Cluster ES14 e família ES14	0,74	2325	2410
Cluster ES1b e família ES1	0,75	2485	2425
Cluster ES19h e família ES19	0,00	1878	3214
Cluster ES8 e família ES8	0,66	1243	1478
Cluster ES14o e família ES14	0,23	2165	2726
Distância média entre isolados de cada família de RFLP e entre isolados do grupo controle			
Grupos comparados	p valor*	Distância média (em metros)	
		Família RFLP	Controle
Família ES14 e grupo controle	0,00	3242	3566
Família ES1 e grupo controle	0,00	3225	3566
Família ES19 e grupo controle	0,00	4326	3566
Família ES8 e grupo controle	0,00	2249	3566

Foi utilizado um Modelo *logit* para análise univariada e multivariada dos fatores de risco associados à transmissão recente da TB. Após a análise univariada foram identificadas como variáveis significativas: idade, raça, raio-X de tórax, baciloscopia positiva, IQU, densidade populacional, número de domicílios com banheiro e esgotamento sanitário via rede geral de esgoto e número de pessoas alfabetizadas por residência ( $p \leq 0.05$ ) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Análise estatística univariada das variáveis individuais

Variáveis	Estimador (valores <i>logit</i> )	Erro padrão	p-valor	
			(diferença do 0)	(diferença do grupo)
Idade (anos) <sup>1</sup>				
0-9	-0,1335	0,8207	0,8709	0,0348
10-19	0,6372	0,3372	0,0595	
20-34	0,07096	0,1844	0,7006	
35-49	0,0106	0,1893	0,9554	
≥ 50	-0,542	0,2249	0,0164	
Sexo				
Feminino	-0,2166	0,1983	0,2754	0,2241
Masculino	0,04173	0,1425	0,7697	
Raça <sup>2</sup>				
Negra	0,4525	0,2375	0,0574	0,0177
Branca	-0,3877	0,2021	0,0558	
Amarela, indígena ou miscigenada	-0,01798	0,1616	0,9115	
Raio-X de tórax				
Normal	-1,3761	0,6768	0,0426	0,0392
Suspeita de TB	0,02599	0,283	0,8396	
Forma da TB <sup>3</sup>				
Extrapulmonar	-0,3885	0,347	0,2635	0,1013
Pulmonar	0,04004	0,1318	0,7614	
Pulmonar/ Extrapulmonar	-0,8586	0,483	0,0762	
HIV				
Negativo	0,05308	0,1531	0,7291	0,2236
Positivo	-0,3551	0,3252	0,2756	
Baciloscopia				
Negativa	-0,4194	0,2444	0,087	0,0375
Positiva	0,116	0,139	0,4044	

<sup>1</sup> 10-19 vs. 35-49, p-valor=0,0888; 10-19 vs. 50+, p=0,0027; 20-34 vs. 50+, p=0,023; 35-49 vs. 50+, p=0,0407

<sup>2</sup> Negra vs. Branca, p=0,0045; Black vs. Amarela/miscigenada, p=0,0752

<sup>3</sup> Pulmonar vs. Pulmonar + Extrapulmonar, p=0,0656



Tabela 5 – Análise estatística univariada das variáveis socioeconômicas.

Variáveis	Estimador (valores logit)	Erro padrão	p-valor	
			(difference from 0)	(group difference)
# domicílios renda mensal > 10 salários mínimos				
0	0,0712	0,1674	0,6709	0,1884
1-2	-0,4003	0,2348	0,0889	
11-20	-0,2882	0,4822	0,5503	
3-5	0,3277	0,3477	0,3464	
6-10	0,3416	0,3316	0,3035	
>20	-0,5485	0,4544	0,228	
# domicílios renda mensal < 10 salários mínimos				
0	-0,00969	0,1528	0,9495	0,9741
1-2	0,02629	0,2221	0,9058	
11-20	-0,1569	0,8557	0,8546	
3-5	-0,1747	0,3571	0,625	
6-10	-0,2574	0,5258	0,6247	
Área urbanizada				
0	-0,01591	0,2898	0,9563	0,9821
1-2	-14,822	1116,89	0,9894	
11-20	0,2282	0,327	0,4856	
3-5	-0,1189	0,8206	0,8849	
6-10	-0,06354	0,5843	0,9134	
>20	-0,05333	0,1437	0,7108	
Renda mensal do responsável pelo domicílio				
300-599	-0.1138	0.1755	0,5171	0,1073
600-999	-0.1007	0.175	0,5655	
<300	0.1338	0.3769	0,7229	
>=1000	1.0197	0.4613	0,0276	
# responsáveis/domicílio com renda mensal ≤ 1 salário mínimo				
0	0.3947	0.6573	0,5485	0,65
1-2	0.1898	0.3379	0,5745	
11-20	-0.02708	0.2231	0,9035	
3-5	-0,00672	0,2667	0,9799	
6-10	-0,3351	0,2274	0,1414	
>20	0,1061	0,2212	0,6318	
# domicílios com banheiro/esgotamento sanitário via rede geral de esgoto				
0	0,003219	0,1364	0,9812	0,1342
1	-0,762	0,4011	0,0581	
>=2	0,2168	0,382	0,5707	
# domicílios com eletricidade †	0,001784	0,00128 4	0,1654	0,1654
# domicílios próprios†	0,04677	0,06093	0,4431	0,4431

Tabela 5 – Análise estatística univariada das variáveis socioeconômicas (continuação).

<b>IQU †</b>	-0,8198	0,2727	0,0028	0,0028
<b>Densidade populacional</b>				
≤50 hab/ha	0,1055	0,2418	0,6628	0,2475
51-100 hab/ha	0,1945	0,2117	0,3588	
101-200 hab/ha	-0,2273	0,2484	0,3605	
>201 hab/ha	-0,4548	0,2966	0,1259	
<b># pessoas alfabetizadas por residencia†</b>				
15-19	0,005961	0,00478	0,213	0,213
20-24	0,008886	0,00482	0,0664	0,0664
25-29	0,007732	0,00397	0,0527	0,0527
30-34	0,007803	0,00494	0,1151	0,1151
60-64	0,006751	0,00556	0,2257	0,2257
65-69	0,008232	0,00388	0,0347	0,0347
<b>** Todas as outras faixas etárias apresentaram p &gt; 0.4</b>				
20-34	0,003072	0,00160	0,0569	0,0569
60-69	0,004296	0,00236	0,0695	0,0695

† As estimativas apresentadas na tabela não são médias dos mínimos quadrados, mas estimadores beta retirados diretamente do modelo. Eles ainda são considerados valores *logit*, mas a interpretação é para uma variável com ítua e não categórica; por exemplo, o aumento de uma unidade no IQU reduz o *log-odds* de pertencer a um *cluster* em 0,29, um aumento de 2 unidades, reduz em 0,58.

Apenas essas variáveis foram incluídas no Modelo *logit* para realização da análise multivariada. A escolha do modelo envolveu a inclusão de todas essas variáveis, seguida da remoção sequencial daquelas que não contribuíram para o ajuste do mesmo. O modelo final identificou três variáveis principais associadas à transmissão recente: idade (faixa etária entre 10-19 anos e 20-34 anos), baciloscopia positiva e IQU baixo. O efeito randômico para cada vizinhança foi a variável de saída (*output*) definida para cada bairro, sendo que valores positivos do estimador log-odds (*logit*) indicam maior chance de pertencer a um *cluster* (Tabela 6). Os valores do estimador log-odds foram convertidos em um valor de probabilidade preditiva por meio da fórmula  $\text{prob} = 1 / (1 + \exp(-RE))$  e esse valor foi mapeado (Figura 8).

Tabela 6 – Análise estatística multivariada das variáveis significativas

Efeito		Estimador (valores <i>logit</i> )	Erro padrão	p-valor
<b>Intercepto</b>		0,3665	0,7842	0,6419
<b>Idade</b>	0-9	1,0895	1,4587	0,4556
	10-19	1,3761	0,4426	0,002
	20-34	0,7828	0,2973	0,0089
	35-49	0,385	0,2933	0,1902
<b>Sexo</b>	Feminino	-0,3667	0,2422	0,131
<b>Raça</b>	Negra	0,3676	0,2756	0,1832
	Branca	-0,2658	0,259	0,3055
<b>Baciloscopia</b>	Negativa	-0,5483	0,2713	0,044
<b>IQU</b>		-0,6886	0,2882	0,0174
# pessoas alfabetizadas/domicílio (20-34 anos)		0,01394	0,001721	0,4185
# domicílios com banheiro/esgotamento sanitário via rede geral de esgoto		-0,01367	0,05358	0,7988

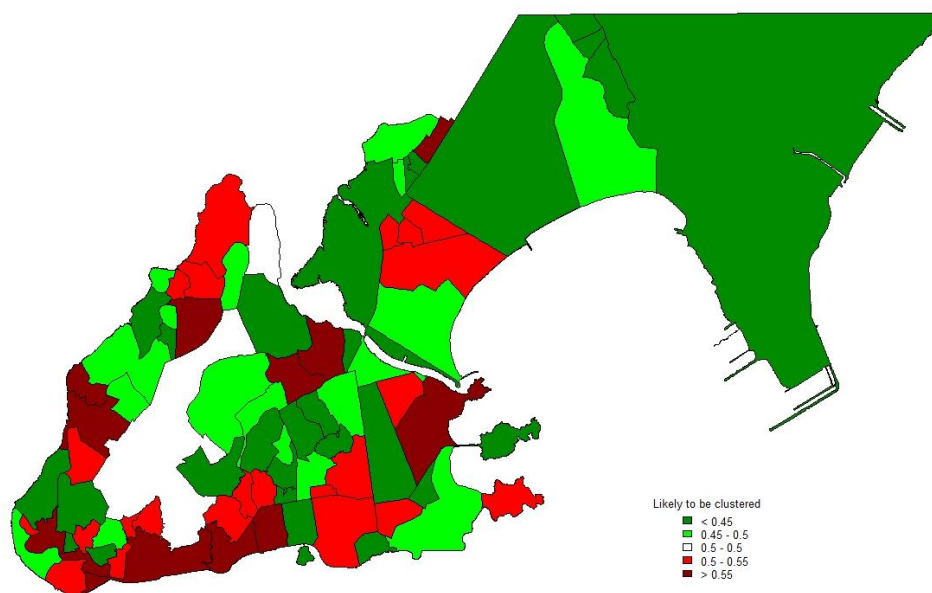


Figure 8 – Valores das probabilidades preditivas de transmissão recente da tuberculose calculados para cada bairro.

## 5. DISCUSSÃO

A proporção de casos novos de TB devido à transmissão recente, em uma determinada comunidade, é o reflexo da eficácia do trabalho realizado pelo PCT naquela comunidade. Altas taxas de transmissão recente da doença indicam que o PCT está agindo de forma inadequada (WHO, 2014; TESSEMA et al., 2013).

No presente estudo, uma alta proporção de isolados com perfis genotípicos de RFLP agrupados em *cluster* foi observada (48%). Utilizando-se o “método n-1”, a proporção estimada de transmissão recente em Vitória foi de 34%. Um estudo de metanálise (HOUBEN; GLYNN, 2009) descreveu uma grande variação nas proporções de *clusterização* encontradas entre 46 estudos analisados, de 6% a 86%, enquanto Fok e colaboradores (2008) descreveram proporções de transmissão recente que variaram de 4% a 60% - com uma proporção média de 28% - entre 35 estudos analisados. Entretanto, a maior parte destes estudos foi realizada em locais de baixa incidência de TB e não foi avaliada a distribuição espacial dos genotipos de *M. tuberculosis* com o objetivo de identificar áreas que apresentassem altas taxas de transmissão recente da doença.

Após a análise por *spoligotyping*, foi observada a predominância da família LAM, responsável por agrupar 57,6% dos isolados. Esta porcentagem é bastante superior à descrita em outros locais na América do Sul (45%) por Ritacco e colaboradores (2011) assim como em São Paulo, Brazil (44,7%) por Martins e colaboradores (2013). Também foi maior do que a media descrita por Gomes et al. (2011) para 11 estados brasileiros (46%). Das 12 sublinhagens já identificadas para a família LAM (BRUDEY ET AL., 2006), oito foram observadas em nosso estudo, enquanto todas as sublinhagens das famílias T e H já descritas, foram observadas.

Uma grande proporção dos isolados agrupados em *clusters* (55%) pertenciam a apenas 4 grandes famílias de RFLP. Além disso, 56% dos isolados classificados como PUs possuíam perfis genotípicos de RFLP muito semelhantes (similaridade superior a 80%) a pelo menos um dos perfis genotípicos dos isolados em *clusters* e pertenciam à mesma família de *spoligotyping* do mesmo. Embora, muitas vezes, façam parte de uma cadeia de transmissão recente, alguns isolados podem ser

classificados como PUs no caso de seu perfil genotípico ter sofrido alguma mudança ao longo do tempo (McNABB et al., 2004). Alguns estudos mostram que a meia-vida de um genotipo de RFLP pode variar dentro de um período de 3 a 10 anos, em algumas situações (deBOER et al., 1999; WARREN et al., 2002). Considerando que nenhuma relação epidemiológica envolvendo esses isolados pôde ser detectada, esses resultados sugerem que a alta incidência de TB nessa região pode estar sendo fortemente influenciada por um número relativamente pequeno de genotipos que circulam ativamente. Sabe-se que em áreas de maior incidência de TB, os perfis genotípicos de RFLP são geralmente menos variáveis do que aqueles observados em áreas de baixa incidência da doença (van SOOLINGEN; HERMANS, 1995). O mesmo foi observado em São Paulo por Ferrazoli e colaboradores (2000). Por esse motivo, no presente estudo, a análise espacial também incluiu as famílias de RFLP e não apenas os isolados agrupados em *clusters*.

A análise de Kernel mostrou claramente 3 áreas com a maior proporção de pessoas cujos isolados estavam agrupados em *clusters* e estas áreas também apresentaram maior razão entre as taxas bayesianas empíricas de casos e controles, o que confirma que estes são os locais de maior risco de transmissão recente da TB. Da mesma maneira, a análise por função K mostrou que tanto os *clusters* quanto as famílias de RFLP tendem a se agrupar geograficamente enquanto os isolados pertencentes ao grupo controle apresentam uma distribuição aleatória.

A análise das distâncias entre pontos permitiu determinar que uma distância média de aproximadamente 2000 metros separa os pacientes de um mesmo *cluster*, sugerindo que, apesar da transmissão da TB não ocorrer na maioria das vezes a nível domiciliar, ela ocorre numa área mais abrangente, porém ainda delimitada. Um estudo realizado em Western Cape, mostrou que a TB não é transmitida primariamente no domicílio (CLASSEN et al., 1999), a exemplo do que ocorreu no nosso estudo, cujo índice de transmissão intradomiciliar foi de apenas 5,7%.

No presente estudo, um modelo *logit* com efeito randômico de vizinhança foi utilizado para se avaliar os fatores de risco associados à transmissão recente da TB. As variáveis idade, baciloscopia positiva e IQU baixo foram identificadas como os principais fatores de risco associados a transmissão recente da TB em Vitória.

Em conjunto, nossos dados demonstram que a transmissão da TB em um ambiente urbano é determinada pelo espaço. O presente estudo mostra que um caso de TB não tende apenas a formar aglomerados espaciais, como descrito anteriormente por Maciel e colaboradores (2010), mas que alguns genótipos de *M. tuberculosis* tendem a se *clusterizar* mesmo após se controlar fatores individuais e socioeconômicos conhecidos que podem influenciar a transmissão. Isso poderia significar que existe uma maior probabilidade da TB ser transmitida dentro de áreas de pobreza e de maior densidade populacional espacialmente definidas, com condições sanitárias e de habitação precárias, onde existe um maior contato humano entre as pessoas que as habitam. A segunda explicação poderia ser a de que a *clusterização* espacial seja uma representação de relações sociais. Geralmente, as pessoas fazem parte de uma rede social existente nos arredores dos seus locais de residência, a qual se comporta de maneira fluida ao longo de uma área urbana. É provável que essa rede seja rompida por barreiras econômicas e raciais quando um indivíduo se move através de um cenário urbano (por exemplo, pessoas que vivem em bairros mais pobres provavelmente interagem e participam de atividades semelhantes, mas quando um indivíduo se muda deste local para outro, que mesmo vizinho, oferece melhor qualidade de vida, os laços entre domicílios ricos e pobres tendem a se romper). Dessa forma, uma vez que um determinado genótipo de *M. tuberculosis* invade uma rede social, é mais provável que haja a propagação daquele genótipo, e dos isolados que compõem sua respectiva família, do que a propagação de linhagens externas. Devido à *clusterização* espacial e aos limites desta rede social, a transmissão deste genótipo é auto-limitante, ou seja, existe uma baixa probabilidade de se propagar para diferentes partes da cidade dependendo de características específicas do indivíduo infectado (utilização de transporte público, situação profissional, etc).

Alguns estudos já sugeriram que a redução da transmissão da TB deva se basear em ações territoriais e não apenas na identificação de contatos (SMALL et al., 1994; BARNES et al., 1997). Nossos dados fornecem uma ferramenta valiosa para a estruturação de um sistema de vigilância com base territorial. A identificação de áreas de risco para a transmissão recente da TB pode também auxiliar o PCT no planejamento de intervenções específicas para estas áreas.

Uma das limitações do nosso estudo foi a realização da análise espacial considerando apenas o local de residência do paciente no momento do diagnóstico. A transmissão pode ocorrer em locais de trabalho, estabelecimentos públicos ou em qualquer outro ambiente, os quais não pudemos identificar. Além disso, apesar de pacientes com resultado de cultura negativo para o *M. tuberculosis* raramente transmitirem o bacilo, a ausência de dados de genotipagem para esses indivíduos significa que a transmissão da TB para os mesmos não pode ser avaliada, o que pode levar a uma subestimação da taxa de transmissão recente nessa população (deVRIES et al., 2008). Por outro lado, como 96.8% dos isolados de pacientes com resultado de cultura positivo foram genotipados, acreditamos que nossos resultados refletem os padrões atuais de transmissão da TB na cidade de Vitória

Como pontos fortes do presente estudo, podemos ressaltar a sua duração (5 anos completos) e a alta porcentagem de genotipagem de isolados (96,8%) provenientes de pacientes que residiam em uma área de estudo bem definida. Como apontado anteriormente por alguns autores, a taxa de *clusterização* depende da duração do estudo, e aumenta na medida em que se aumenta a duração do mesmo, atingindo um *plateau* após um período de aproximadamente 4 anos (JASMER et al., 1999; vanSOOLINGEN et al., 1999; GLYNN et al., 2005), enquanto amostras de tamanho reduzido e áreas de estudo mal definidas podem resultar em proporções de *clusterização* subestimadas (HOUBEN; GLYNN, 2009).

## 6. CONCLUSÕES

A partir da análise de dados genotípicos e espaciais, foi possível caracterizar o perfil genotípico das cepas de *M. tuberculosis* circulantes no município de Vitória-ES, no período de janeiro de 2003 a dezembro de 2007. Foram identificados 70 *clusters* pertencentes a 12 famílias de RFLP.

A taxa de transmissão recente na população de pacientes arrolados no estudo foi de 34%.

Com base nas análises espaciais foi possível identificar três áreas de maior ocorrência de transmissão recente da TB no município de Vitória: central, oeste e sudoeste.

Os principais fatores de risco associados a transmissão recente identificados no estudo foram: idade (faixa etária entre 10-19 anos e 20-34 anos), baciloscopia positiva e IQU baixo.

As estratégias utilizadas pelo PCT na busca de novos casos de TB se baseiam, quase que exclusivamente, na identificação de pacientes sintomáticos que procuram os serviços de atenção primária em saúde e rastreamento dos contatos domiciliares dos casos confirmados. Nossos resultados sugerem a implementação de estratégias inovadoras para o controle e prevenção da doença, como a busca de casos novos e o rastreamento de contatos que tenham como base o território. Além disso, deve-se analisar as redes sociais estabelecidas em diferentes locais para se determinar quais os tipos de contatos/relações sociais podem levar à ocorrência dos padrões de transmissão observados em áreas urbanas.

Nesse contexto, a associação entre geoprocessamento e técnicas de genotipagem torna-se uma importante ferramenta a ser utilizada pelo PCT no melhoramento das ações de controle e prevenção da doença, especialmente em países de alta incidência da doença.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAND, D.; KALKUT, G.E.; MOSS, A.R.; MCADAM, R.A.; HAHN, J.A.; BOSWORTH, W.; DRUCKER, E.; BLOOM, B.R. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med*, n.330, p. 1710-1716, 1994.

ALI, M.; EMCH, M.; DONNAY, J.P.; YUNUS, M.; SACK, R.B. The spatial epidemiology of cholera in an endemic area of Bangladesh. *Soc Sci Med*, v. 55, n. 6, p. 1015-1024, 2002.

Barnes, P.F.; Yang, Z.; Preston-Martin, S.; Pogoda, J.M.; Jones, B.E.; Otaia, M.; Eisenach, K.D.; Knowles, L.; Harvey, S.; Cave, M.D. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *JAMA*, v.278, p.1159-63,1997.

BATISTA, J. Spatial dynamics of trees in a brazilian atlantic tropical forest under natural and managed conditions. 1994. 330 f. Thesis (PhD thesis)-University of Washington, Seattle, 1994.

BAUER, J.; ANDERSEN, A.B.; KREMER, K.; MIORNER, H. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol*, v. 37, p. 2602-2606, 1999.

BISHAI, W.R.; GRAHAM, N.M.; HARRINGTON, S.; POPE, D.S.; HOOPER, N.; ASTEMBORSKI, J.; SHEELY, L.; VLAHOV, D.; GLASS, G.E.; CHAISSON, R.E. Molecular and geographic patterns of tuberculosis transmission after 15 years of directly observed therapy. *JAMA*, v. 280, n. 19, p. 1679-1684,1998.

BLOOM, B.R. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington: American society for microbiology, 637p.,1994.

BOER, A.S. de; BORGDORFF, M.W.; HAAS, P.E. de; NAGELKERKE, N.J.; VAN EMBDEN, J.D.; VAN SOOLINGEN, D. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. J Infect Dis, v. 180, n. 4, p. 1238-1244, 1999.

BORGDORFF, M.W.; NAGELKERKE, N.; VAN SOOLINGEN, D.; DE HAAS, P.E.; VEEN, J.; VAN EMBDEN, J.D. Analysis of tuberculosis transmission between nationalities in the Netherlands in the period 1993-1995 using DNA fingerprinting. Am J Epidemiol, v. 147, n.2, p. 187-195, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil, 2011.

BRODIE, D.; SCHLUGER, N.W. The diagnosis of tuberculosis. Clin Chest Med, v. 26, n. 2, p. 247-271, 2005.

BRUDEY, K.; DRISCOLL, J.R.; RIGOUTS, L.; PRODINGER, W.M.; GORI, A.; AL-HAJOJ, S.A.; ALLIX, C.; ARISTIMUÑO, L.; ARORA, J.; BAUMANIS, V.; BINDER, L.; CAFRUNE, P.; CATALDI, A.; CHEONG, S.; DIEL, R.; ELLERMEIER, C.; EVANS, J.T.; FAUVILLE-DUFAUX, M.; FERDINAND, S.; GARCIA DE VIEDMA, D.; GARZELLI, C.; GAZZOLA, L.; GOMES, H.M.; GUTTIEREZ, M.C.; HAWKEY, P.M.; VAN HELDEN, P.D.; KADIVAL, G.V.; KREISWIRTH, B.N.; KREMER, K.; KUBIN, M.; KULKARNI, S.P.; LIENS, B.; LILLEBAEK, T.; HO, M.L.; MARTIN, C.; MOKROUSOV, I.; NARVSKAIA, O.; NGEOW, Y.F.; NAUMANN, L.; NIEMANN, S.; PARWATI, I.; RAHIM, Z.; RASOLOFO-RAZANAMPARANY, V.; RASOLONAVALONA, T.; ROSSETTI, M.L.; RÜSCH-GERDES, S.; SAJDUDA, A.; SAMPER, S.; SHEMYAKIN, I.G.; SINGH, U.B.; SOMOSKOVI, A.; SKUCE, R.A.; VAN SOOLINGEN, D.; STREICHER, E.M.; SUFFYS, P.N.; TORTOLI, E.; TRACEVSKA, T.; VINCENT, V.; VICTOR T.C.; WARREN, R.M.; YAP, S.F.; ZAMAN, K.; PORTAELS, F.; RASTOGI, N.; SOLA C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. BMC Microbiol, v. 6, p. 6-23, 2006.

CÂMARA, G.; MONTEIRO, A.M.V.; DRUCK, S.; CARVALHO, M.S. Análise espacial e geoprocessamento. In: Análise espacial de dados geográficos, 2002. Disponível em <http://www.dpi.inpe.br/gilberto/livro/analise/>.

CANETTI, G.; FOX, W.; KHOMENKO, A.; MAHLER, H.T.; MENON, N.K.; MITCHISON, D.A.; RIST, N.; SMELEV, N.A. Advances in techniques of testing of testing mycobacterial drug sensitivity, and use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bulletin of the World Health Organization, v.4, p. 21-43, 1969.

CHAULET, P.; RAVIGLIONE, M.; BUSTREO, F. Epidemiology, control and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. Drugs, v.52, n.2, p. 103-108, 1996.

CLASSEN, C.N.; WARREN, R.; RICHARDSON, M.; HAUMAN, J.H.; GIE, R.P.; ELLIS, J.H.; VAN HELDEN, P.D.; BEYERS, N. Impact of social interactions in the community on the transmission of tuberculosis in a high incidence area. Thorax, v. 54, p.136–140, 1999.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Tuberculosis bacteriology: organization and practice. 2 ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997.

DEMAY, C.; LIENS, B.; BURGUIÈRE, T.; HILL, V.; COUVIN, D.; MILLET, J.; MOKROUSOV, I.; SOLA, C.; ZOZIO, T.; RASTOGI, N. SITVITWEB - A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. Infect Genet Evol, v. 12, n. 4, p. 755-766, 2012.

de VRIES, G.; BAARS, H.W.; SEBEK, M.M.; van HEST, N.A.; RICHARDUS, J.H. Transmission classification model to determine place and time of infection of tuberculosis cases in an urban area. J Clin Microbiol, v. 46, p.3924-3930, 2008.

DIAZ, R.; KREMER, K.; HAAS, P.E. de; GOMEZ, R.I.; MARRERO, A.; VALDIVIA, J.A.; VAN EMBDEN, J.D.; Van SOOLINGEN, D. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994-June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism. Int J Tuberc Lung Dis, v. 2, p. 743-750, 1998.

DROBNIIEWSKI, F.A.; KENT, R.J.; STOKER, N.G.; UTTLEY, A.H. Molecular biology in the diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Hosp Infect*, v. 28, n. 4, p. 249-263, 1994.

EU - European Union. European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis 2006. Beijing. *W* genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis* 12: 736-743.

EUZÉBY, J.P. LSPN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/>. Acessado em 11 de fevereiro de 2014.

FERRAZOLI, L.; PALACI, M.; MARQUES, L.R.; JAMAL, L.F.; AFIUNE, J.B.; CHIMARA, E.; MARTINS, M.C.; SILVA TELLES, M.A.; OLIVEIRA, C.A.; PALHARES, M.C.; SPADA, D.T.; RILEY, L.W. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 4, n. 1, p. 18-25, 2000.

FILLIOL, I.; DRISCOLL, J.R.; VAN SOOLINGEN, D.; KREISWIRTH, B.N.; KREMER, K.; VALÉTIUDIE, G.; ANH, D.D.; BARLOW, R.; BANERJEE, D.; BIFANI, P.J.; BRUDEY, K.; CATALDI, A.; COOKSEY, R.C.; COUSINS, D.V.; DALE, J.W.; DELLAGOSTIN, O.A.; DROBNIIEWSKI, F.; ENGELMANN, G.; FERDINAND, S.; GASCOYNE-BINZI, D.; GORDON, M.; GUTIERREZ, M.C.; HAAS, W.H.; HEERSMA, H.; KÄLLENIUS, G.; KASSA-KELEMBHO, E.; KOIVULA, T.; LY, H.M.; MAKRIATHIS, A.; MAMMINA, C.; MARTIN, G.; MOSTRÖM, P.; MOKROUSOV, I.; NARBONNE, V.; NARVSKAYA, O.; NASTASI, A.; NIOBE-EYANGO, S.N.; PAPE, J.W.; RASOLOFO-RAZANAMPARANY, V.; RIDELL, M.; ROSSETTI, M.L.; STAUFFER, F.; SUFFYS, P.N.; TAKIFF, H.; TEXIER-MAUGEIN, J.; VINCENT, V.; DE WAARD, J.H.; SOLA, C.; RASTOGI, N. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis*, v. 8, n. 11, p. 1347-1349, 2002.

FIÚZA DE MELO, F.A.; AFIUNE, J.B. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. *J Pneumol*, v. 19, p. 19-24, 1993.

FOK, A.; NUMATA, Y.; SCHULZER, M.; FITZGERALD, M.J. Risk factors for clustering of tuberculosis cases: a systematic review of population-based molecular epidemiology studies. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 12, n. 5, p. 480-492, 2008.

FOXMAN, B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol*, v. 153, p. 1135-1141, 2001.

GENG, E.; KREISWIRTH, B.; DRIVER, C.; LI, J.; BURZYNSKI, J.; DELLALATTA, P.; LAPAZ, A.; SCHLUGER, N.W. Changes in the transmission of tuberculosis in New York City from 1990 to 1999. *N Engl J Med*, n.346, p. 1453-1458, 2002.

GLYNN, J.R.; WHITELEY, J.; BIFANI, P.J.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis*, v. 8, p. 843-849, 2002.

GLYNN, J.R.; CRAMPIN, A.C.; YATES, M.D.; TRAORE, H.; MWAUNGULU, F.D.; NGWIRA, B.M.; NDLOVU, R.; DROBNIEWSKI, F.; FINE, P.E. The importance of recent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in an area with high HIV prevalence: a long-term molecular epidemiological study in Northern Malawi. *J Infect Dis*, v. 192, p. 480-487, 2005.

GOLUB, J.E.; CRONIN, W.A.; OBASANJO, O.O.; COGGIN, W.; MOORE, K.; POPE, D.S.; THOMPSON, D.; STERLING, T.R.; HARRINGTON, S.; BISHAI, W.R.; CHAISSON, R.E. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* through casual contact with an infectious case. *Arch Intern Med*, v. 161, n. 18, p. 2254-2258, 2001.

GRANGE, J.M. **Mycobacteria and human disease**. 2<sup>Ed</sup>. London: University Press, 1996.

HAVLIR, D. V.; BARNES, P. F. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, v. 340, p. 367-373, 1999.

HEATH, T.C.; ROBERTS, C.; WINKS, M.; CAPON, A.G. The epidemiology of tuberculosis in New South Wales 1975-1995: the effects of immigration in a low prevalence population. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 2, n. 8, p. 647-654, 1998.

HOBBY, G.L.; HOLMAN, A.P.; ISEMAN, M.D.; JONES, J. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 4, n. 2, p. 94-104, 1973.

HOUBEN, R.M.; GLYNN, J.R. A systematic review and meta-analysis of molecular epidemiological studies of tuberculosis: development of a new tool to aid interpretation. *Trop Med Int Health*, v. 14, n. 8, p. 892-909, 2009.

ICHIYAMA, S., SHIMOKATA, K.; TAKEUCHI, J. Comparative study of a biphasic culture system (Roche MB check system) with a conventional egg medium for recovery of mycobacteria. *Tuberc Lung Dis*, v. 74, n. 5, p. 338-341, 1993.

JASMER, R.M.; HAHN, J.A.; SMALL, P.M.; DALEY, C.L.; BEHR, M.A.; MOSS, A.R.; CREASMAN, J.M.; SCHECTER, G.F.; PAZ, E.A.; HOPEWELL, P.C. A molecular epidemiologic analysis of tuberculosis trends in San Francisco, 1991-1997. *Ann Intern Med*, n. 130, p. 981-978, 1999.

JOHNSON, J.L.; HADAD, D.J.; DIETZE, R.; MACIEL, E.L.; SEWALI, B.; GITTA, P.; OKWERA, A.; MUGERWA, R.D.; ALCANESES, M.R.; QUELAPIO, M.I.; TUPASI, T.E.; HORTER, L.; DEBANNE, S.M.; EISENACH, K.D.; BOOM, W.H. Shortening treatment in adults with noncavitary tuberculosis and 2-month culture conversion. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 180, n. 6, p. 558-563, 2009.

KAMERBEEK, J.; SCHOOLS, L.; KOLK, A.; Van AGTERVELD, M.; Van SOOLINGEN, D.; KUIJPER, S.; BUNSCHOTEN, A.; MOLHUIZEN, H.; SHAW, R.; GOYAL, M.; Van EMBDEN, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, v. 35, p. 907-914, 1997.

KANDUMA, E.; McHUGH, T.D.; GILLESPIE, S.H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. J Appl Microbiol, v. 94, n. 5, p. 781-791, 2003.

KENT, P.T.; KUBICA, G.P. **Public health mycobacteriology – a guide for level III laboratory**. Atlanta, Centers for Disease Control, 1985.

KIM, T.C.; BLACKMAN, R.S.; HEATWOLE, K.M.; KIM, T.; ROCHESTER, D.F. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pretreatment and positive smears post-treatment. Am Rev Respir Dis, v. 129, n. 2, p. 264-268, 1984.

KIMERLING, M.E.; BENJAMIN, W.H.; LOK, K.H.; DUNLAP, N.E. Restriction fragment length polymorphism screening of *Mycobacterium tuberculosis* isolates: population surveillance for targeting disease transmission in a community. Int J Tuberc Lung Dis, v.2, p. 655-662, 1998.

KREMER, K.; van SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W.H.; HERMANS, P.W.; MARTIN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B.B.; RILEY, L.W.; YAKRUS, M.A.; MUSSER, J.M.; van EMBDEN, J.D. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol, v. 37, n. 8, p. 2607-2618, 1999.

KULLDORFF, M.; NAGARWALLA, N. Spatial disease clusters: detection and inference. Stat Med, v. 14, n. 8, p. 799-810, 1995.

LAN, N.T.; LIEN, H.T.; TUNG, L.E.; BORGDORFF, M.W.; KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and risk for treatment failure and relapse, Vietnam. Emerg Infect Dis, v. 9, p. 1633-1635, 2003.

LAZZARINI, L.C.; HUARD, R.C.; BOECHAT, N.L.; GOMES, H.M.; OELEMANN, M.C.; KUREPINA, N.; SHASHKINA, E.; MELLO, F.C.; GIBSON, A.L.; VIRGINIO, M.J.; MARSICO, A.G.; BUTLER, W.R.; KREISWIRTH, B.N.; SUFFYS, P.N.; LAPA E SILVA, J.R.; HO, J.L. Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.*, v. 45, n. 12, p. 3891-3902, 2007.

LEITE, C.Q.F.; TELAROLLI JUNIOR, R. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. *Rev Ciênc Farm*, v. 18, n. 1, p. 17-28, 1997.

LIBERATO, I.R.; DE ALBUQUERQUE, M.F.; CAMPELO, A.R.; DE MELO, H.R. Characteristics of pulmonary tuberculosis in HIV seropositive and seronegative patients in a Northeastern region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 37, n. 1, p. 46-50, 2004.

MACIEL, E.L.; PAN, W.; DIETZE, R.; PERES, R.L.; VINHAS, S.A.; RIBEIRO, F.K.; PALACI, M.; RODRIGUES, R.R.; ZANDONADE, E.; GOLUB, J.E. Spatial patterns of pulmonary tuberculosis incidence and their relationship to socio-economic status in Vitoria, Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis*, n.14, p.1395-1402, **2010**.

MADICO, G.; GILMAN, R.H.; CHECKLEY, W.; CABRERA, L.; KOHLSTADT, I.; KACENA, K.; DIAZ, J.F.; BLACK, R. Community infection ratio as an indicator for tuberculosis control. *Lancet*, v.345, n.8947, p.416-419, 1995.

MARAIS, B.J.; VICTOR, T.C.; HESSELING, A.C.; BARNARD, M.; JORDAAN, A.; BRITTLE, W.; REUTER, H.; BEYERS, N.; VAN HELDEN, P.D.; WARREN, R.M.; SCHAAF, H.S. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape province of South Africa. *J Clin Microbiol*, v. 44, p. 3539-3543, 2006.



MARTINS, M.C.; GIAMPAGLIA, C.M.; OLIVEIRA, R.S.; SIMONSEN, V.; LATRILHA, F.O.; MONIZ, L.L.; COUVIN, D.; RASTOGI, N.; FERRAZOLI, L. Population structure and circulating genotypes of drug-sensitive and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in São Paulo state, Brazil. *Infect Genet Evol*, v. 14, p.39-45, 2013.

McADAM, R.A.; HERMANS, P.W.; Van SOOLINGEN, D.; ZAINUDDIN, Z.F.; CATTY, D.; VAN EMBDEN, J.D.; DALE, J.W. Characterization of a *M. tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol*, v. 4, n. 9, p. 1607-1613, 1990.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília-DF, 2011. Disponível em [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat\\_tec/manuais/MS11\\_Manual\\_Recom.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/TB/mat_tec/manuais/MS11_Manual_Recom.pdf)

MORGAN, M.A.; HORSTMEIER, C.D.; DeYOUNG, D.R.; ROBERTS, G.D. Comparison study of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear-negative specimens. *J Clin Microbiol*, v. 18, n. 2, p. 384-388, 1983.

MOTA, F.F.; VIEIRA-DA-SILVA, L.M.; PAIM, J.S., COSTA, M.C. Spatial distribution of tuberculosis mortality in Salvador, Bahia, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, v.19, n.4, p.915-922, 2003.

MUNCH, Z.; VAN LILL, S.W.; BOOYSEN, C.N.; ZIETSMAN, H.L.; ENARSON, D.A.; BEYERS, N. Tuberculosis transmission patterns in a high-incidence area: a spatial analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 7, n. 3, p. 271-277, 2003.

MURRAY, M.; NARDELL, E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. *Bull World Health Organ*, v. 80, p. 477-482, 2002.

NAVA-AGUILERA, E.; ANDERSSON, N.; HARRIS, E.; MITCHELL, S.; HAMEL, C.; SHEA, B.; LÓPEZ-VIDAL, Y.; VILLEGAS-ARRIZÓN, A.; MORALES-PÉREZ, A. Risk factors associated with recent transmission of tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*, v.13, n.1, p. 17-26, 2009.

NGUYEN, L.N.; GILBERT, G.L.; MARKS, G.B. Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis. *Respirology*, v. 9, n. 3, p. 313-319, 2004.

NUNN, P.; WILLIAMS, B.; FLOYD, K.; DYE, C.; ELZINGA, G.; RAVIGLIONE, M. Tuberculosis control in the era of HIV. *Nat Rev Immunol*, v. 5, n. 10, p. 819-826, 2005.

PABLO-MENDES, A.; RAVIGLIONE, M.C.; BATTAN, R.; RAMOS-ZUNIGA, R. Global surveillance for antituberculosis – drug resistance, 1994-1997. *N Eng J Med*, v. 338, p. 1641-1649, 1998.

PALACI, M.; DIETZE, R.; HADAD, D.J.; RIBEIRO, F.K.; PERES, R.L.; VINHAS, S.A.; MACIEL, E.L.; DO VALLE DETTONI, V.; HORTER, L.; BOOM, W.H.; JOHNSON, J.L.; EISENACH, K.D. Cavitary disease and quantitative sputum bacillary load in cases of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 12, p. 4064-4006, 2007.

RIBEIRO, F.K.C.; DETTONI, V.V.; PERES, R.L.; VINHAS, S.A.; CÓ, T.R.; DIETZE, R.; PALACI, M. Evaluation of a commercial test based on ligase chain reaction for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 37, n. 6, p.431-435, 2004.

RIPLEY, B.D. Tests of ‘randomness’ for spatial point patterns, *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 41, p.368–374, 1979.

RITACCO, V.; IGLESIAS, M.J.; FERRAZOLI, L.; MONTESERIN, J.; DALLA COSTA, E.R.; CEBOLLADA, A.; MORCILLO, N.; ROBLEDO, J.; DE WAARD, J.H.; ARAYA, P.; ARISTIMUÑO, L.; DÍAZ, R.; GAVIN, P.; IMPERIALE, B.; SIMONSEN, V.; ZAPATA, E.M.; JIMÉNEZ, M.S.; ROSSETTI, M.L.; MARTIN, C.; BARRERA, L.; SAMPER, S. Conspicuous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cluster strains do not trespass country borders in Latin America and Spain. *Infect Genet Evol*, v.12, n. 4, p. 711-717, 2012.

RODRIGUES, M. Geoprocessamento: Um retrato atual. *Revista Fator GIS*, n. 2, p. 20-23, 1993.

SAUNDERS, N.A. State of the art: typing *Mycobacterium tuberculosis*. *J Hosp Infect*, v. 29, n. 3, p. 169-176, 1995.

SCHÜRCH, A.C.; Van SOOLINGEN, D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: From phage typing to whole-genome sequencing. *Infect Genet Evol*, v. 12, n. 4, p. 602-609, 2012.

SEBEK, M. DNA fingerprinting and contact investigation. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 4, n. 2, p. 45-48, 2000.

SHARMA, S.K.; MOHAN, A.; KADHIRAVAN, T. HIV-TB co-infection: epidemiology, diagnosis & management. *Indian J Med Res*, v.121, p.550-567, 2005.

SMALL, P.M.; HOPEWELL, P.C.; SINGH, S.P.; PAZ, A.; PARSONNET, J.; RUSTON, D.C.; SCHECTER, G.F.; DALEY, C.L.; SCHOOLNIK, G.K. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med*, v.330, n.24, p. 1703-1709, 1994.

SOLA, C.; FILLIOL, I.; LEGRAND, E.; MOKROUSOV, I.; RASTOGI, N. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. J Mol Evol, v. 53, n. 6, p. 680-689, 2001.

SUFFYS, P.N.; IVENS DE ARAUJO, M.E.; ROSSETTI, M.L.; ZAHAB, A.; BARROSO, E.W.; BARRETO, A.M.; CAMPOS, E.; VAN SOOLINGEN, D.; KREMER, K.; HEERSMA, H.; DEGRAVE, W.M. Usefulness of IS6110-restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. Res Microbiol, v. 151, p. 343-351, 2000.

TARANTINO, A.B.; LEITÃO DE OLIVEIRA, M.C. Tuberculose. Arq Bras Med, v. 64, p. 123-131, 1990.

TELLES, M.A.; FERRAZOLI, L.; WALDMAN, E.A.; GIAMPAGLIA, C.M.; MARTINS, M.C.; UEKI, S.Y.; CHIMARA, E.; SILVA, C.A.; CRUZ, V.; WALDMAN, C.C.; HEYN, I.; HIRONO, I.U.; RILEY, L.W. A population-based study of drug resistance and transmission of tuberculosis in an urban community. Int J Tuberc Lung Dis, v. 9, n. 9, p. 970-976, 2005.

TESSEMA, B.; BEER, J.; MERKER, M.; EMMRICH, F.; SACK, U.; RODLOFF, A.C.; NIEMANN, S. Molecular epidemiology and transmission dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in Northwest Ethiopia: new phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia. BMC Infect Dis, v. 13, p. 131, 2013.

Van EMBDEN, J.D.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.T.; DALE, J.W.; EISENACH, K.D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; McADAM, R.; SHINNICK, T.M.; SMALL, P.M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol, v. 31, n. 2, p. 406-409, 1993.

VAN SOOLINGEN, D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J Intern Med, v.249, n.1, p.1-26, 2001.

Van SOOLINGEN, D.; De HAAS,P.E.; HERMANS, P.W.; GROENEN, P.M.; Van EMBDEN, J.D. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. J Clin Microbiol, v. 31, n. 8, p. 1987-1995, 1993.

Van SOOLINGEN, D.; HERMANS, P.W. Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. Eur Respir J Suppl, v.20, p. 649-656, **1995**.

Van SOOLINGEN, D.; BORGDORFF, M.W.; DE HAAS, P.E.; SEBEK, M.M.; VEEN, J.; DESSENS, M.; KREMER, K.; VAN EMBDEN, J.D. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. J Infect Dis, v. 180, n.3, p. 726-736, 1999.

VITOL, I.; DRISCOLL, J.; KREISWIRTH, B.; KUREPINA, N.; BENNETT, KP. Identifying *Mycobacterium tuberculosis* complex strain families using spoligotypes. Infect Genet Evol, v. 6, n. 6, p. 491-504, 2006.

WAYNE, L.G.; KUBICA, G.P. **Genus Mycobacteria**. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Eds.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1436-1457.

WOLINSKY, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. Am Rev Respir Disease, v. 119, n. 1, p. 107-159, 1979.

YEAGER, H.J.; LACY, J.S.; SMITH, L.R.; LEMAISTRE, C. Quantitative studies on mycobacterial populations in sputum and saliva. Am Rev Respir Dis, v. 95, n. 6, p. 998-1004, 1967.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2013. Geneva, Switzerland: WHO Report 2014.